

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Caractérisation du tissu cicatriciel glial dans un modèle Murin d'hémisection médullaire : focus sur l'acide hyaluronique

Renard, Gwendoline

Award date:
2016

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITÉ DE NAMUR

Faculté des Sciences

**CARACTÉRISATION DU TISSU CICATRICIEL GLIAL DANS UN MODÈLE MURIN
D'HÉMISECTION MÉDULLAIRE : FOCUS SUR L'ACIDE HYALURONIQUE**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Gwendoline RENARD

Janvier 2016

Caractérisation du tissu cicatriciel glial dans un modèle murin d'hémisection médullaire : focus sur l'acide hyaluronique

RENARD Gwendoline

Résumé

Après une lésion de la moelle épinière, les victimes sont invalidées selon la sévérité du traumatisme et le segment médullaire touché, leur qualité de vie en est considérablement réduite et leurs chances de récupération fonctionnelle faible. Par conséquent, il est capital de comprendre les mécanismes physiopathologiques post-lésionnels qui entravent la récupération fonctionnelle. Durant les phases aiguë et chronique post-traumatisme, les cellules gliales synthétisent une nouvelle matrice extracellulaire (MEC). La MEC du système nerveux central est composée de protéoglycans, de ténascines ainsi que d'acide hyaluronique (HA). Il est connu que la MEC synthétisée après un traumatisme nerveux joue un rôle à la fois bénéfique, en isolant le tissu lésé du tissu péri-lésionnel sain, mais aussi délétère en empêchant toute repousse axonale ultérieure. Cette dernière est rendue impossible par la cicatrice gliale. Elle constitue à la fois une barrière physique, liée à la présence de cellules gliales de type astrocytes et microgliocytes, et une barrière chimique dans laquelle de larges quantités de chondroïtine sulfate protéoglycans (CSPGs) sont déposées. Ces CSPGs sont connus pour inhiber la croissance axonale ainsi que la remyélinisation. Ce projet se concentre sur l'étude d'un glycosaminoglycan majeur localisé dans la MEC, l'HA, dont le rôle est encore peu connu dans le système nerveux central sain ou blessé. Afin de caractériser la quantité et la distribution spatio-temporelle de l'HA après l'induction d'une lésion dans la moelle épinière, un modèle murin d'hémisection médullaire thoracique est utilisé. Les animaux récupèrent totalement leur fonction motrice quelques jours après l'opération. Une cicatrice gliale a clairement été mise en évidence, de par la présence d'astrocytes et de microgliocytes activés. De plus, l'HA est détecté du côté ipsilatéral à la lésion et ce, de manière plus importante 6 semaines après le trauma médullaire. Les astrocytes ne semblent pas être à l'origine de la synthèse de ce glycosaminoglycan *in vivo*, lorsqu'une lésion de la moelle épinière survient, bien qu'ils soient capables d'en produire *in vitro*. Enfin, après une hémisection, *HYAL2* semble plus exprimée. *HAS3* l'est également, mais uniquement 6 semaines après le trauma médullaire. Quant à *HAS1*, son expression est significativement réduite 2 semaines après le trauma.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2016

Promoteur: C. Nicaise

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon promoteur, Monsieur Charles Nicaise, pour son accueil au sein de son laboratoire, pour ses nombreux conseils et le temps qu'il a consacré à la réalisation de ce mémoire.

Ensuite, je remercie Joanna Bouchat, mon encadrante, pour son aide, son enthousiasme, son optimisme et sa bonne humeur. Ses nombreux encouragements m'ont permis de conserver ma motivation tout au long de ce projet.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du LabCeTi pour son accueil et sa bonne humeur, qui ont permis de travailler dans une ambiance détendue et agréable. Un merci plus particulier à Jérémy et Kathleen pour leur aide précieuse. Une pensée également pour Mika et son humour légendaire, Benoit et Nicolas pour leur bonne humeur quotidienne.

Merci également à Coraline Leirens pour ses petites visites qui ne manquaient jamais de nous remonter le moral.

Je remercie les membres de mon jury, Florence Chainiaux, Yves Poumay, Jean-Jacques Letesson et Adrien Latli pour avoir pris le temps de lire mon mémoire.

Une petite pensée également à Lorraine, ma meilleure amie et ma principale source de motivation durant toutes ces années ainsi qu'à Stéphanie pour son aide et son soutien.

Enfin, un ultime merci à mes parents et à mon frère pour leurs encouragements tout au long de ce parcours universitaire.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

1. Le système nerveux central.....	5
1.1. Organisation du système nerveux central.....	5
○ <i>Les neurones</i>	5
○ <i>Les fibres nerveuses</i>	5
○ <i>La névroglie</i>	6
1.2. La moelle épinière	7
○ <i>Les fonctions</i>	7
○ <i>La substance blanche et la substance grise</i>	7
○ <i>La matrice extracellulaire</i>	8
1.3. Les lésions de la moelle épinière	10
○ <i>Implication des protéoglycans et des glycosaminoglycans</i>	11
2. L'acide hyaluronique	12
2.1. La localisation	13
2.2. Le métabolisme	13
○ <i>La synthèse</i>	13
○ <i>La dégradation</i>	14
2.3. Les récepteurs.....	16
2.4. Les fonctions	16
○ <i>Rôle dans la MEC</i>	17
○ <i>Rôle dans l'inflammation</i>	17
2.5. Implication de l'HA dans les lésions de la moelle épinière	18
3. Objectifs du mémoire.....	18

MATÉRIEL & MÉTHODES

<i>In vivo</i>	20
1. Animaux.....	20

2. Procédure chirurgicale	20
3. Soins post-opératoires	21
4. Traitement des tissus pour l'histologie	21
4.1. Cryostat.....	21
4.2. Paraffine.....	22
4.3. Expériences	22
○ Coloration Eriochrome C- Crésyl violet	22
○ Marquage immunohistochimique de la GFAP	23
○ Marquage de l'HA à l'aide de l'HABP	23
○ Double marquage fluorescent	24
5. Dosage HA (ELISA-like)	24
5.1. Préparation des échantillons	24
5.2. Protocole du dosage.....	25
6. Analyse de l'expression des ARNm par qRT-PCR.....	25
6.1. Préparation des échantillons	25
6.2. Extraction d'ARN.....	26
6.3. Reverse transcription.....	26
6.4. PCR quantitative.....	27
7. Évaluation fonctionnelle des animaux.....	27
7.1. Basso Mouse Scale (BMS)	27
7.2. Rotarod et Hanging Wire.....	28
○ Rotarod	28
○ Hanging wire	28
<i>In vitro</i>	28
1. Culture des précurseurs des cellules gliales.....	28
1.1. Coating des flasks de culture	28
1.2. Culture des précurseurs gliaux	29
1.3. Différenciation des cellules GRP en astrocytes	29
2. Marquage fluorescent des cellules GRP et des astrocytes.....	29
3. Dosage HA (ELISA-like)	29

RÉSULTATS

Résultats in vivo	31
1. Génération d'un modèle murin d'hémisection médullaire	31
1.1. Caractérisation fonctionnelle	31
○ <i>La BMS</i>	31
○ <i>Rotarod et Hanging Wire</i>	32
1.2. Caractérisation morphologique	33
○ <i>Organisation de la moelle épinière</i>	33
○ <i>Perte neuronale</i>	34
○ <i>Longueur et volume des lésions</i>	34
2. Mise en évidence de la cicatrice gliale	35
2.1. Implication des astrocytes	35
2.2. Présence de microglie au sein de la cicatrice gliale	36
3. Quantification de l'HA dans les moelles épinières intactes et lésées	37
4. Mise en évidence de l'HA dans la moelle épinière	37
4.1. Étude de la distribution intramédullaire de l'HA	37
4.2. Étude de la co-localisation de l'HA avec les astrocytes	38
5. Étude de l'expression des ARNm des hyaluronan synthases et des hyaluronidases	39
Résultats in vitro	40
1. La différenciation des cellules GRP en astrocytes	40
2. Quantification de l'HA	40

DISCUSSION & CONCLUSION

1. Génération d'un modèle murin d'hémisection médullaire	41
2. Caractérisation morphologique des lésions de la moelle épinière	43
3. Formation d'une cicatrice gliale	43

4. Implication de la microglie	44
5. L'HA dans les moelles épinières intactes et lésées	45
6. Implication des astrocytes dans la production d'HA	46
7. Expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'HA	47
8. Conclusion	48

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie.....	49
--------------------	----

INTRODUCTION

Introduction

1. Le système nerveux central

1.1. Organisation du système nerveux central

Le système nerveux central est constitué par le cerveau, le cervelet, le tronc cérébral et la moelle épinière.

La substance grise et la substance blanche constituent deux tissus différents au sein du système nerveux central. La substance grise contient les corps cellulaires des neurones, les différents prolongements des cellules nerveuses ainsi que ceux des cellules gliales pour former le neuropile. Ces prolongements sont localisés autour des corps cellulaires des neurones, des cellules gliales et des capillaires sanguins. En ce qui concerne la substance blanche, celle-ci contient des vaisseaux sanguins, des cellules gliales, (micro- et macroglie) ainsi que des fibres nerveuses entourées d'une gaine de myéline (Poumay, 2015).

○ *Les neurones*

Le corps cellulaire des neurones est appelé le péricaryon et contient le noyau. Ce dernier est volumineux, sphérique, est constitué principalement d'euchromatine et possède un nucléole proéminent. Les péricaryons sont localisés dans la substance grise du système nerveux central. Les neurones sont également constitués d'un axone. Il s'agit d'un prolongement unique qui permet de transférer l'influx nerveux du péricaryon vers son extrémité, le bouton terminal. En parcourant l'axone et en arrivant au niveau de la terminaison synaptique, l'influx nerveux aboutit *in fine* au relargage de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ensuite, ils se lient au niveau de récepteurs post-synaptiques sur le neurone post-synaptique pour transmettre l'information. Les neurones possèdent également des dendrites. Il s'agit de multiples prolongements qui transfèrent les informations qu'ils reçoivent vers le péricaryon (Poumay, 2015).

○ *Les fibres nerveuses*

Les prolongements des neurones (axones ou dendrites) forment les fibres nerveuses. Ils sont soutenus par un réseau de microtubules ainsi que de filaments intermédiaires. Les fibres nerveuses peuvent être enveloppées par des gaines isolantes en fonction de l'endroit où elles se trouvent dans l'organisme.

Dans la substance grise du système nerveux central, les prolongements ne possèdent pas de gaine. En revanche, dans la substance blanche, des fibres nerveuses myélinisées (avec la gaine de myéline) sont retrouvées. La gaine de myéline, de nature protéique et lipidique (phospholipides, cholestérol, cérébrosides, lécithines et sphingomyélines), est fabriquée par les oligodendrocytes interfasciculaires, des cellules gliales du système nerveux central. Plus précisément, il s'agit d'un prolongement cytoplasmique spécialisé de l'oligodendrocyte s'enroulant autour de l'axonème. Chacun de ces prolongements forme un segment de gaine de myéline situé entre 2 nœuds de Ranvier. Cette structure constitue un isolant électrique. En

effet, cela permet d'augmenter la vitesse de conduction de l'influx nerveux par rapport aux fibres nerveuses amyélinisées (Poumay, 2015).

- *La névroglie*

La névroglie représente l'ensemble des cellules non-neuronales. Celles-ci sont localisées autour des neurones et assurent un rôle de soutien, de nutrition, de maintien de l'homéostasie tissulaire ou encore de défense immunitaire. Dans le système nerveux central, la névroglie est divisée en deux parties : la névroglie épithéliale et la névroglie interstitielle.

La névroglie épithéliale consiste en une couche de cellules gliales accolées les unes à côté des autres grâce à des complexes de jonctions. Cette structure tapisse les cavités du système nerveux central. C'est notamment le cas pour le canal de l'épendyme, qui contient le liquide céphalo-rachidien. Dans ce cas, les cellules qui le constituent sont appelées les cellules épendymaires ou épendymocytes. Les épendymocytes ont pour rôle de gérer les échanges qui se réalisent entre le liquide céphalo-rachidien et le tissu nerveux du système nerveux central.

Les cellules des plexus choroïdes font également partie de la névroglie épithéliale. Elles contribuent à la fabrication du liquide céphalo-rachidien.

La névroglie interstitielle est constituée des cellules gliales qui se trouvent dans la substance grise et la substance blanche du système nerveux central. Cette névroglie interstitielle est divisée en deux parties : la macroglie et la microglie.

La macroglie, d'origine ectodermique, est composée par les astrocytes protoplasmiques, les astrocytes fibreux ainsi que les oligodendrocytes.

Les astrocytes constituent les cellules gliales majoritaires dans le système nerveux central (Struve *et al.*, 2005). Ce sont des cellules étoilées possédant des prolongements. Ils sont divisés en deux types : les astrocytes protoplasmiques et les astrocytes fibreux. Les astrocytes protoplasmiques sont localisés principalement dans la substance grise. Ils possèdent des prolongements longs, épais et ramifiés. Au contraire, les astrocytes fibreux sont localisés dans la substance blanche. Ils sont caractérisés par la présence de prolongements fins, longs et peu ramifiés. Les prolongements de ces deux types d'astrocytes peuvent entrer en contact avec le corps cellulaire, l'axone ou la dendrite d'un neurone ou avec les capillaires sanguins. Le cytoplasme de ces cellules contient la protéine fibrillaire acide (GFAP), une protéine des filaments intermédiaires. Ces derniers sont très nombreux dans les astrocytes fibreux, au contraire des astrocytes protoplasmiques. Les astrocytes possèdent diverses fonctions. De manière non-exhaustive, ils guident la migration des neurones durant le développement embryonnaire, ils servent de support structural pour les cellules nerveuses, ils captent les nutriments issus du sang, les transmettent aux neurones et évacuent les déchets, ils sont impliqués dans la régulation du flux sanguin au sein du système nerveux central et participent à la barrière hémato-encéphalique, ils interviennent dans le métabolisme des neurotransmetteurs et fournissent des facteurs trophiques aux neurones. Enfin, si le système nerveux central est lésé, ils réagissent en s'activant et en proliférant afin d'isoler le tissu lésé

du tissu sain péri-lésionnel. Dès lors, ils interviennent dès lors dans la formation d'une cicatrice gliale post-lésionnelle.

Les oligodendrocytes sont des cellules gliales qui possèdent un petit corps cellulaire et ne présentent que très peu de prolongements. Ils produisent la gaine de myéline qui entoure les fibres nerveuses se trouvant dans la substance blanche. Les oligodendrocytes localisés dans la substance blanche, à proximité des fibres nerveuses, sont appelés oligodendrocytes interfasciculaires. Parfois, des oligodendrocytes s'agencent autour des corps cellulaires des neurones, dans la substance grise. Ceux-ci sont alors appelés oligodendrocytes satellites.

Les cellules de la microglie (microgliocytes), d'origine mésodermique, ne représentent qu'un faible pourcentage des cellules gliales. Les microgliocytes sont de très petite taille et possèdent de longs et nombreux prolongements ramifiés. Ils sont localisés dans l'entièreté du système nerveux central, et plus particulièrement dans le voisinage des vaisseaux sanguins et des péricaryons. Ils possèdent une capacité de phagocytose limitée (Poumay, 2015).

1.2. La moelle épinière

La moelle épinière fait partie du système nerveux central. Il s'agit d'une structure longue et cylindrique d'environ 45 cm chez l'Homme et comprise dans les corps vertébraux osseux de la colonne vertébrale. Elle se trouve logée dans le canal vertébral duquel elle est séparée par les méninges. Elle débute en-dessous du foramen magnum (ou trou occipital) et se prolonge jusqu'au bord inférieur de la première vertèbre lombaire. Elle est caractérisée par la présence de deux élargissements au niveau cervical ainsi qu'au niveau lombaire et est fractionnée en 31 segments : 8 segments cervicaux, 12 segments thoraciques, 5 segments lombaires, 5 segments sacrés et 1 segment coccygien. Une paire de nerfs spinaux sort de chaque segment de moelle et est issue de la fusion des racines médullaires ventrales et dorsales (Parent & Carpenter, 1996).

○ *Les fonctions*

La moelle épinière joue un rôle capital dans la transmission des informations dans le système nerveux. En effet, elle reçoit les signaux afférents par l'intermédiaire des racines dorsales des nerfs spinaux et les transmet en direction du cerveau par l'intermédiaire des voies médullaires ascendantes. Ces signaux proviennent de récepteurs somatiques et viscéraux couvrant la majeure partie du corps. La moelle épinière donne également naissance aux radicelles des racines ventrales des nerfs spinaux qui innervent des effecteurs somatiques et viscéraux. De plus, elle participe à la transmission de l'information dans les voies descendantes ainsi qu'aux réflexes somatiques et végétatifs (Parent & Carpenter, 1996).

○ *La substance blanche et la substance grise*

En section transversale, la moelle épinière est constituée de deux parties. La partie centrale de la moelle épinière est la substance grise, composée des corps cellulaires neuronaux ainsi que du début de leurs prolongements. Cette portion centrale est dessinée en forme de papillon. La deuxième partie est la substance blanche, qui entoure le papillon central. Celle-ci contient les

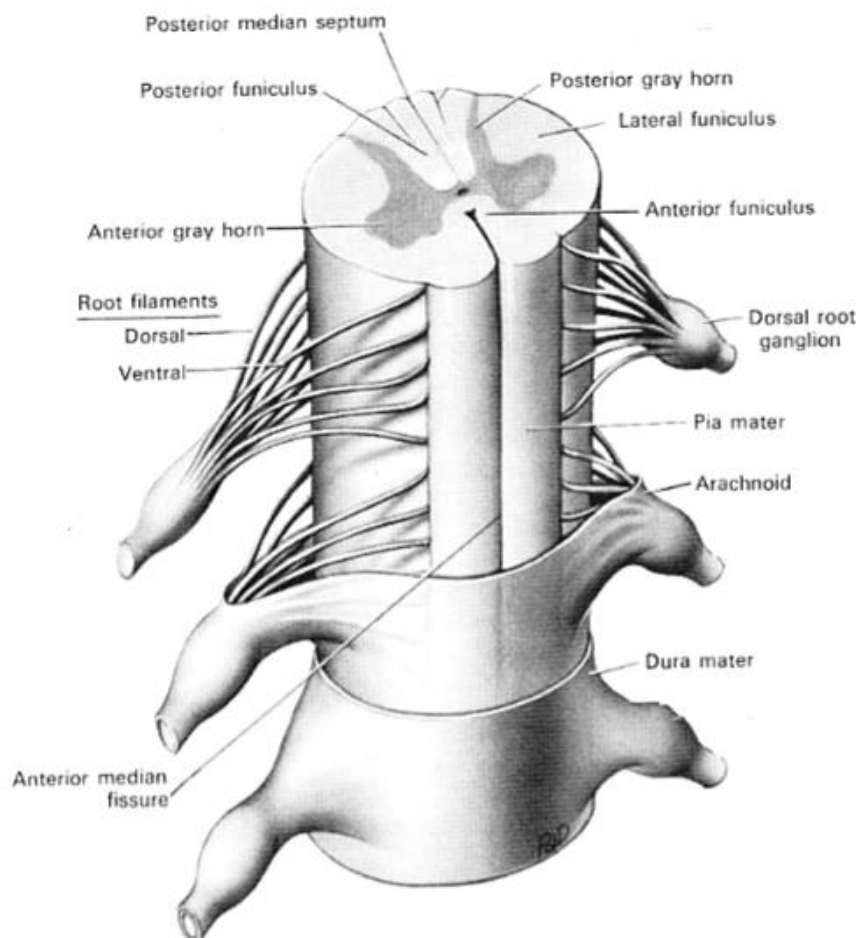


Figure 1 : Anatomie de la moelle épinière (Parent & Carpenter, 1996)

En section transversale, la moelle épinière est constituée de deux parties. La partie centrale de la moelle épinière est la substance grise, en forme de papillon. Elle est divisée en différentes portions : les cornes ventrales et les cornes dorsales. La deuxième partie est la substance blanche, qui entoure la partie centrale. Elle est divisée en 3 paires de funiculi: les funiculi postérieurs, les funiculi antérieurs et les funiculi latéraux. Sur la face antérieure de la moelle épinière, la fissure médiane antérieure est visible. Au niveau de la face postérieure, le sillon médian postérieur s'enfonce jusque dans la substance grise de la moelle épinière pour former le septum médian postérieur.

Les méninges entourent le cerveau et la moelle épinière et sont composées de 3 membranes : la dure-mère (membrane épaisse la plus externe), l'arachnoïde (fine membrane qui tapisse la surface interne de la dure-mère) et la pie-mère (membrane la plus interne qui suit intimement les contours du cerveau et de la moelle épinière).

fibres nerveuses myélinisées ascendantes et descendantes. La forme et la taille du papillon central varient en fonction du segment médullaire (Figure 1) (Parent & Carpenter, 1996).

La substance grise est constituée de neurones et de leurs prolongements (dendrites ou axones), de fibres nerveuses ainsi que de cellules gliales (Parent & Carpenter, 1996 ; Silva *et al.*, 2014). Elle est divisée en différentes portions : les cornes ventrales et les cornes dorsales. Tout d'abord, les cornes ventrales s'étendent de façon antérieure, sans atteindre le bord de la moelle épinière. En revanche, les cornes dorsales, qui s'étendent postérieurement et latéralement, aboutissent à la surface et ce, à proximité de la zone d'entrée des racines dorsales des nerfs spinaux. Au centre de la moelle épinière, et plus particulièrement à l'endroit où se rejoignent les cornes ventrales et les cornes dorsales, se trouve le canal épendymaire. Ce dernier est entouré de quelques astrocytes fibreux (Figure 1) (Parent & Carpenter, 1996).

La substance blanche contient principalement des fibres nerveuses myélinisées ascendantes et descendantes (Parent & Carpenter, 1996 ; Silva *et al.*, 2014). Elle est divisée en 3 paires de funiculi (ou cordons) qui entourent le papillon formé par la substance grise : les funiculi postérieurs, les funiculi antérieurs et les funiculi latéraux. Les funiculi postérieurs sont les plus grands et sont localisés entre les cornes dorsales de la substance grise et le septum médian postérieur. Alors que chez l'Homme les funiculi postérieurs convoient une information sensitive, chez les rongeurs, ils convoient également le tractus descendant cortico-spinal responsable de l'innervation motrice des membres antérieurs et postérieurs. Chez l'Homme, ce sont les funiculi latéraux qui contiennent le tractus corticospinal. Les funiculi antérieurs se trouvent entre la fissure médiane antérieure et la zone d'émergence des filaments des racines ventrales des nerfs spinaux. Cette dernière délimite également, avec la zone d'entrée des fibres des racines dorsales des nerfs spinaux, les funiculi latéraux (Figure 1) (Parent & Carpenter, 1996).

○ *La matrice extracellulaire*

Le système nerveux central contient les neurones, les cellules non-neuronales et un réseau de prolongements qui ont été décrits précédemment. Il est également composé d'une matrice extracellulaire (MEC) qui occupe l'espace intercellulaire. La MEC du système nerveux central consiste en des proteoglycans et des glycosaminoglycans tel que l'acide hyaluronique (HA) (Galtrey *et al.*, 2008 ; Silva *et al.*, 2014). Les quatre classes de protéoglycans sont les héparan sulfate protéoglycans, les dermatan sulfate protéoglycans, les keratan sulfate protéoglycans et les chondroïtine sulfate protéoglycans (CSPGs : famille de protéoglycans dont les membres sont notamment l'aggrécane, le versican, le neurocan et le phosphacan) (Galtrey *et al.*, 2008 ; Bonneh-Barkay & Wiley, 2009 ; Silva *et al.*, 2014). Dans le système nerveux central, la majorité des protéoglycans est composée avec des chaînes latérales de chondroïtine sulfate et d'héparan sulfate (Bonneh-Barkay & Wiley, 2009). Ils sont principalement exprimés par les astrocytes, les précurseurs des oligodendrocytes et les cellules méningées (Galtrey *et al.*, 2008 ; Bonneh-Barkay & Wiley, 2009 ; Silva *et al.*, 2014). Ces protéoglycans peuvent réguler l'adhésion cellulaire, la croissance des neurites, l'assemblage de la MEC ainsi que l'invasion des cellules tumorales (Ruoslahti, 1996). Au

contraire, la fibronectine, la vibronectine et le collagène, qui sont des composantes classiques de la MEC dans les autres tissus, sont présents en moindre quantité (Ruoslahti, 1996 ; Bonneh-Barkay & Wiley, 2009).

Dans le système nerveux central, la MEC est divisée en 2 compartiments : une matrice diffuse ainsi que des structures plus denses qui sont localisées autour des neurones et des dendrites. Ces structures réticulées sont appelées les filets périneuronaux. Dans la moelle épinière, la composition des filets périneuronaux diffère de celle de la MEC diffuse. En effet, ces 2 compartiments sont constitués d'HA, de ténascine-R et de quelques CSPGs mais les filets périneuronaux contiennent de l'aggrécan et des protéines de liaison qui ne sont pas retrouvés dans la MEC diffuse. De plus, le contenu en CSPGs dans les filets périneuronaux peut également varier (Galtrey *et al.*, 2008 ; Bonneh-Barkay & Wiley, 2009).

Les filets périneuronaux apparaissent après la naissance, lorsque les connexions synaptiques se stabilisent. Ils se trouvent partout dans la substance grise, entourant la majorité des corps cellulaires des neurones ainsi qu'autour des prolongements. Toutefois, la proportion de neurones possédant un filet périneuronal varie en fonction de la localisation dans la moelle épinière. Ces structures particulières jouent un rôle dans le développement neuronal et sont probablement impliquées dans le contrôle de la plasticité neuronale. Une modification dans leur composition peut favoriser la plasticité et la récupération fonctionnelle (Galtrey *et al.*, 2008 ; Bonneh-Barkay & Wiley, 2009).

Les différentes composantes de la MEC du système nerveux central sont caractérisées par des distributions différentes dans la moelle épinière (Galtrey *et al.*, 2008) :

L'**aggrécan** est un protéoglycan abondamment retrouvé dans le cartilage (Ruoslahti, 1996). Dans la moelle épinière, il est produit par les neurones et est retrouvé dans tous les filets périneuronaux localisés dans la substance grise. En revanche, il n'est pas présent dans le neuropile. Il jouerait un rôle capital dans la formation des filets périneuronaux (Galtrey *et al.*, 2008).

Le **versican** est très abondant dans le cerveau (Ruoslahti, 1996). Dans la moelle épinière, il est produit par les oligodendrocytes. Il est localisé de façon diffuse (et à des niveaux élevés) dans le neuropile ainsi que de façon plus concentrée dans la plupart des filets périneuronaux (Galtrey *et al.*, 2008).

Le **neurocan** est produit par les neurones (Ruoslahti, 1996). Il est caractérisé par la même distribution que le versican, si ce n'est qu'il n'est pas présent dans tous les filets périneuronaux. Il n'est pas essentiel à la formation des filets périneuronaux, de même que le versican (Galtrey *et al.*, 2008).

Le **phosphacan** est localisé dans la plupart des filets périneuronaux de la moelle épinière ainsi que dans le neuropile et la substance blanche. Il est suggéré que le phosphacan subit une modification particulière lorsqu'il se trouve dans les filets périneuronaux, ce qui donne naissance à une autre forme de ce CSPG. Ce protéoglycan ainsi que le versican et le neurocan

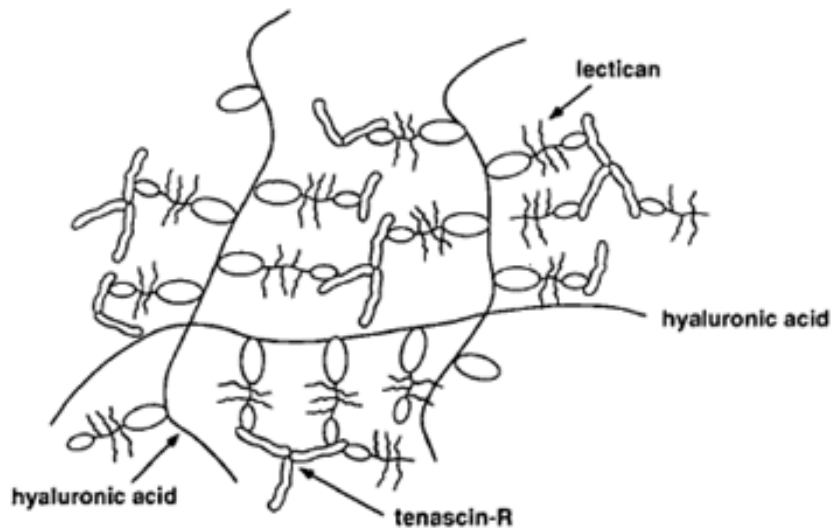


Figure 2 : Composition de la MEC dans le système nerveux central (Ruoslahti, 1996)

La MEC du système nerveux central consiste principalement en des proteoglycans et des glycosaminoglycans. Elle contient de l'HA, la ténascine-R ainsi que quelques lecticans (versican, neurocan, aggrécan et brévican). Ces derniers constituent un groupe de protéoglycans appartenant à la famille des CSPGs. L'HA joue le rôle de squelette de la MEC sur lequel les CSPGs (dont les lecticans) se lient. La ténascine-R participe à la réticulation entre l'HA et les CSPGs.

sont synthétisés par les cellules gliales et les neurones. Il a été démontré récemment que la forme transmembranaire du phosphacan est notamment produite par les neurones, ce qui permettrait l'attachement de ces derniers aux filets périneuronaux (Galtrey *et al.*, 2008).

Les **protéines de liaison** stabilisent les liaisons de diverses molécules à l'HA (Galtrey *et al.*, 2008 ; Bonneh-Barkay & Wiley, 2009). Les protéines de liaison CRTL 1 (Cartilage link protein 1) et BRAL 2 sont localisées dans tous les filets périneuronaux de la substance grise de la moelle épinière mais ne sont pas présents dans le neuropile, tout comme l'aggrécane. Elles auraient également une fonction importante dans la formation des filets périneuronaux. En effet, leur expression augmente fortement juste avant le développement de ces structures (Galtrey *et al.*, 2008).

L'**HA** est présent de manière diffuse dans la MEC et de façon plus condensée dans tous les filets périneuronaux ainsi que le long des dendrites dans la substance blanche. L'HA joue le rôle de squelette de la MEC sur lequel les CSPGs se lient, stabilisés par les protéines de liaison (Figure 2) (Fraser *et al.*, 1997 ; Galtrey *et al.*, 2008). L'HA est donc une composante capitale de la MEC. Il est synthétisé par les neurones et ce, par l'intermédiaire des hyaluronan synthases localisées dans la membrane plasmique. Ces dernières, en synthétisant l'HA et en l'exportant dans la MEC, pourraient donc être à l'origine de l'attachement des neurones avec les filets périneuronaux (Galtrey *et al.*, 2008). De plus, comme il a été démontré dans le cartilage, la liaison entre l'HA et l'aggrécane pourrait servir de coussin au cerveau. En effet, dans le cartilage, le complexe HA-aggrécane peut se lier à une grande quantité d'eau qui est rejetée lorsque le cartilage est comprimé et retourne dans la MEC lorsque la compression est terminée. Ce mécanisme pourrait se passer dans le cerveau afin de protéger ce dernier contre la pression (Ruoslahti, 1996 ; Fraser *et al.*, 1997).

La **ténascine-R** est caractérisée par la même répartition que l'HA dans la MEC et les filets périneuronaux. Elle possède plusieurs fonctions : elle est impliquée dans la réticulation entre l'HA et les CSPGs, elle module la plasticité synaptique et joue un rôle dans la formation des filets périneuronaux (Figure 2) (Galtrey *et al.*, 2008).

1.3. Les lésions de la moelle épinière

2.5 millions de personnes dans le monde sont atteintes par des lésions de la moelle épinière et 130 000 nouveaux cas surviennent chaque année (Kundi *et al.*, 2013). Ces traumatismes ont pour origine des dommages physiques tels que des contusions, des transections ou des compressions de la moelle épinière, qui résultent de blessures par balles, d'accidents de voitures, d'accidents de sport ou des chutes (Silva *et al.*, 2014). Ces lésions de la moelle épinière provoquent des conditions dévastatrices, les soins sont chers et la durée ainsi que la qualité de vie des individus sont fortement réduites (Kundi *et al.*, 2013 ; Takeuchi *et al.*, 2013). Ces patients peuvent perdre leurs capacités locomotrices, leurs fonctions sensorielles et autonomes (le système digestif et le tractus uro-génital) et ils peuvent être atteints de dysfonctions cardiaques et respiratoires (Silva *et al.*, 2014)

Lorsqu'un traumatisme apparaît, différentes phases sont observées, indépendamment du type de blessure. La première est la phase aiguë, qui apparaît dans les minutes qui suivent, jusqu'aux

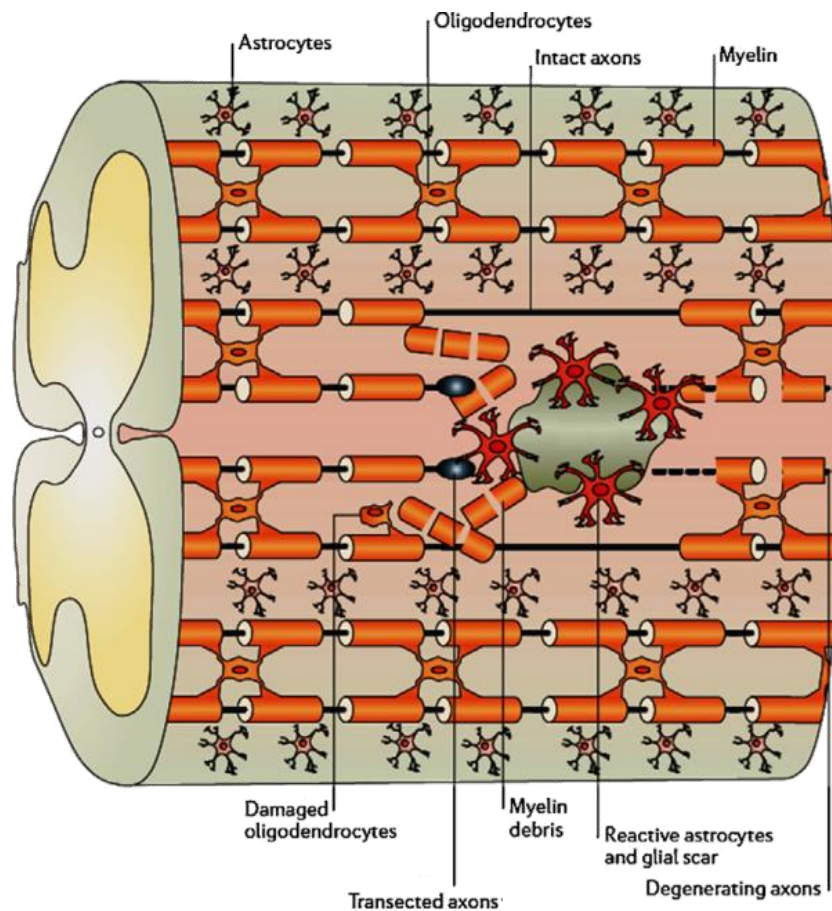


Figure 3 : Mécanismes mis en place suite à l'induction d'un trauma médullaire (Silva *et al.*, 2014)

Lorsqu'un trauma apparaît, différentes phases sont observées. La blessure primaire est la blessure mécanique en elle-même qui survient au moment du trauma et qui résulte en l'interruption des faisceaux ascendants et descendants. La blessure primaire est suivie de la seconde phase, principalement en raison des perturbations dans l'homéostasie du système nerveux central. Elle est notamment caractérisée par de la neuroinflammation, la perturbation de la barrière hémato-encéphalique ainsi qu'une activation de la microglie. Dans la phase chronique, la perte de la conduction nerveuse ainsi que la démyélinisation des fibres nerveuses sont observées. Cette démyélinisation est la conséquence de la perte des oligodendrocytes et cause la dégénération des axones. La cicatrice gliale est également formée et consiste principalement en l'activation et la prolifération d'astrocytes. Lorsqu'elle est totalement formée, elle forme une sorte de mur qui empêche la régénération des fibres sectionnées et les processus de remyélinisation.

premiers jours après la lésion. Elle est divisée en deux parties : la lésion primaire et la lésion secondaire. La lésion primaire est le traumatisme mécanique en lui-même (une hémisection par exemple) et qui résulte en l'interruption des faisceaux ascendants et descendants ainsi qu'en une perte immédiate des cellules nerveuses dans l'épicentre. La lésion primaire est suivie de la seconde phase, principalement en raison des perturbations de l'homéostasie du système nerveux central. Elle est caractérisée par de la neuroinflammation, une hémorragie, de l'hypoxie (rupture de la continuité des vaisseaux sanguins), la perturbation de la barrière hémato-encéphalique à l'origine de l'œdème, une activation de la microglie, de la nécrose, de l'apoptose (des neurones, des oligodendrocytes et de la microglie), la formation d'une cavité remplie de liquide céphalo-rachidien (syringomyélie), ainsi que par une excitotoxicité. Par conséquent, dans les jours qui suivent, la lésion s'étend à la fois du côté rostral et du côté caudal à partir de l'épicentre. La dernière étape est appelée la phase chronique. Elle persiste dans les jours, voire dans les années qui suivent la blessure. Dans cette phase, la perte de la conduction nerveuse ainsi que la démyélinisation des fibres nerveuses sont observées. Cette démyélinisation est la conséquence de la perte des oligodendrocytes et est à l'origine d'un blocage de la conduction nerveuse au niveau où l'axone n'est plus myélinisé. Durant cette partie, la réparation tissulaire se met également en place dans laquelle un tissu cicatriciel, appelé la cicatrice gliale, est formé. La formation de cette cicatrice gliale consiste en l'activation et la prolifération d'astrocytes, en l'invasion de cellules immunitaires (macrophages dérivés du sang et la microglie résidente du système nerveux central) ainsi qu'en l'infiltration de cellules méningées et de fibroblastes dans le cas d'une transection. (Struve *et al.*, 2005 ; Khaing *et al.*, 2011 ; Kundi *et al.*, 2013 ; Silva *et al.*, 2014). Toutes ces cellules contribuent au nettoyage des débris se trouvant dans la lésion ainsi qu'au remodelage et à la néosynthèse de la MEC du système nerveux central autour de la lésion de la moelle épinière (Kundi *et al.*, 2013 ; Silva *et al.*, 2014). Des molécules de la MEC sont également présentes. Cette cicatrice gliale isole le tissu neural endommagé du tissu normal environnant (Struve *et al.*, 2005). Cependant, lorsqu'elle est totalement formée, elle forme une sorte de mur qui empêche la régénération des fibres sectionnées et les processus de remyélinisation (Struve *et al.*, 2005 ; Kundi *et al.*, 2013 ; Silva *et al.*, 2014). Cela permet d'expliquer le fait que les personnes atteintes d'une lésion à la moelle épinière présentent une récupération fonctionnelle très limitée (Figure 3) (Takeushi *et al.*, 2013).

○ *Implication des protéoglycans et des glycosaminoglycans*

Il a été démontré que les protéoglycans sont impliqués dans la formation de la cicatrice gliale et certains d'entre eux sont capables de favoriser la régénération axonale alors que d'autres l'inhibent (Bonneh-Barkay & Wiley, 2009 ; Silva *et al.*, 2014). Par exemple, le chondroïtine sulfate est un glycosaminoglycan très présent dans le système nerveux central et un puissant inhibiteur de la régénération axonale. Il est synthétisé principalement par les astrocytes réactifs après une lésion de la moelle épinière. Il a été démontré que l'inhibition de sa synthèse améliore fortement la récupération après une lésion de la moelle épinière. Les souris invalidées pour l'une des enzymes impliquées dans la synthèse du chondroïtine sulfate, la N-acetylgalactosaminyltransferase-1, montrent un temps de récupération plus rapide que les souris wild-type après un trauma médullaire. De plus, ils ont observé que cette récupération

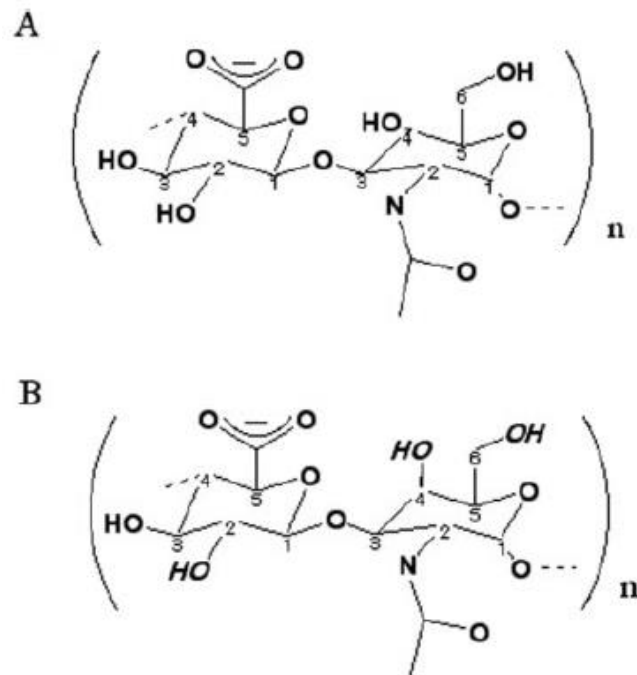


Figure 4 : Structure de l'acide hyaluronique et de la chondroïtine (Stern, 2003)

(A) Structure de l'acide hyaluronique : polysaccharide à longue chaîne constitué par des répétitions de disaccharides d'acide glucuronique (à gauche) et de N-acétylglucosamine (à droite).

(B) Structure de la chondroïtine : polysaccharide constitué par des répétitions de disaccharides d'acide glucuronique (à gauche) et de N-acétylgalactosamine (à droite).

est liée à la régénération axonale, suite à la réduction de la taille de la cicatrice gliale. Cependant, une petite quantité de chondroïtine sulfate est tout de même nécessaire puisqu'il permet de réduire l'inflammation en empêchant l'invasion des macrophages (Takeuchi *et al.*, 2013). Le neurocan, dont la quantité augmente après un trauma, serait également un inhibiteur de la repousse axonale (Bonneh-Barkay & Wiley, 2009). Au contraire, l'héparan sulfate est un promoteur puissant de la régénération axonale (Takeuchi *et al.*, 2013).

2. L'acide hyaluronique

L'HA est une molécule chargée négativement. Il s'agit d'un polysaccharide linéaire à longue chaîne qui consiste en des répétitions de disaccharides d'acétylglucosamine et d'acide glucuronique reliés entre eux par des liaisons β 1-3 et β 1-4 (Figure 4). Contrairement aux autres glycosaminoglycans, celui-ci est le seul qui n'est pas attaché à une protéine et qui n'est pas sulfaté (Fraser *et al.*, 1997 ; Itano & Kimata, 2002 ; Stern, 2003 ; Stern, 2004 ; Vigetti *et al.*, 2014). De plus, les glycosaminoglycans ne font en général qu'entre 15 et 20 kDa, tandis que l'HA peut atteindre des poids moléculaires beaucoup plus importants (Fraser *et al.*, 1997).

Le taux de renouvellement de l'HA est très rapide. En effet, un individu de 70 kg possède approximativement 15 g d'HA dont le tiers est renouvelé chaque jour. Toutefois, ce taux de renouvellement varie en fonction du tissu concerné. Dans le sang, l'HA possède un temps de demi-vie de 2 à 3 minutes tandis que dans la peau, celui-ci est de 1 à 2 jours (dans l'épiderme). Enfin, dans le cartilage, qui est un tissu relativement inerte, le temps de demi-vie atteint entre 1 et 3 semaines (Stern, 2003 ; Stern, 2004). Une étude a démontré que les vaisseaux lymphatiques transportent une grande quantité d'HA dans la circulation sanguine. Cela s'explique par le fait que dans la peau et les articulations, 20 à 30 % de l'HA présent y est dégradé et le reste est enlevé par les vaisseaux lymphatiques. Ensuite, lorsque l'HA se trouve dans le flux sanguin, 85 à 90% est éliminé dans le foie, 10% sont extraits par les reins et 1 à 2% sont excrétés dans l'urine. Étant donné l'absence d'une voie lymphatique dans le cartilage et les os, la majorité de l'HA s'y trouvant y est dégradé sur place (Fraser *et al.*, 1997).

L'HA peut voir sa concentration augmenter lors de phénomènes biologiques tels que lors du développement embryonnaire ainsi que lors de phénomènes pathologiques (stress, phénomènes cancéreux, inflammation, œdème, infarctus du myocarde, brûlures importantes, septicémies, réparation de blessures) (Csoka *et al.*, 2001 ; Stern, 2003 ; Stern, 2004).

Ce glycosaminoglycan possède diverses fonctions et ce, en fonction de son poids moléculaire. Il favorise la motilité cellulaire, il régule les interactions entre les cellules ainsi que celles entre les cellules et la MEC et il favorise la prolifération cellulaire tout en inhibant la différenciation (Stern, 2004). Il est capable d'exercer ces différentes fonctions en interagissant avec différentes composantes de la MEC ainsi qu'avec des récepteurs de membrane tels que CD44 et RHAMM (Stern, 2003 ; Vigetti *et al.*, 2014).



Figure 5 : Synthèse de l'HA (Redessiné à partir de Itano & Kimata, 2001)

L'HA est synthétisé au niveau de la membrane plasmique par les hyaluronan synthases qui sont des enzymes transmembranaires. Ce sont des glycosyltransférases qui ajoutent successivement l'acide glucuronique et l'acétylglucosamine pour former les chaînes d'HA au niveau de la face interne de la membrane plasmique avant de les transloquer dans la MEC.

2.1. La localisation

L'HA est principalement localisé dans la MEC, où il est présent sous une forme atteignant 10^5 à 10^7 Da. Il s'agit donc d'HA de haut poids moléculaire. Au niveau cellulaire, l'HA est retrouvé dans le glycocalyx ainsi qu'au pôle apical des cellules endothéliales. Ce glycosaminoglycan est également retrouvé en intracellulaire, et plus particulièrement dans le cytoplasme, dans le noyau et dans le nucléole (Stern, 2003). Il existe une hypothèse selon laquelle l'HA se trouverait également dans des mini-organites, les hyaluronasomes. Ils seraient localisés au niveau de la membrane plasmique, du côté cytoplasmique. Ces granules pourraient répondre à des événements intracellulaires et extracellulaires et ce, par l'intermédiaire de récepteurs de l'HA tels que CD44 ou RHAMM. En effet, les enzymes de synthèse et de dégradation de l'HA seraient également présentes dans les hyaluronasomes (Stern, 2003 ; Stern, 2004).

L'HA est présent principalement dans la peau (50% de l'HA total), les articulations, le squelette, l'humeur vitrée de l'œil, la gelée de Wharton du cordon ombilical, le liquide amniotique, les tissus fœtaux ainsi que dans tous les tissus possédant une capacité de prolifération importante (tissus en réparation ou contenant des cellules cancéreuses) (Fraser *et al.*, 1997 ; Csoka *et al.*, 2001 ; Stern, 2003 ; Stern, 2004).

2.2. Le métabolisme

○ La synthèse

L'HA ne diffère pas seulement des autres glycosaminoglycans de par sa composition, mais également de par sa synthèse. Effectivement, la synthèse de l'HA ne se réalise pas au niveau de l'appareil de Golgi, comme pour tous les glycosaminoglycans. Elle se déroule au niveau de la membrane plasmique des cellules et ce, à l'aide des hyaluronan synthases. Ces dernières produisent les chaînes d'HA au niveau de la face interne de la membrane plasmique avant de les transloquer dans la MEC. Le mécanisme par lequel l'HA est externalisé n'est pas encore connu (Figure 5) (Fraser *et al.*, 1997 ; Itano & Kimata, 2002 ; Stern, 2003 ; Stern, 2004 ; Vigetti *et al.*, 2014).

Chez les mammifères, 3 hyaluronan synthases sont décrites : Has1, Has2 et Has3. Elles possèdent des propriétés biochimiques différentes. En effet, ces 3 enzymes synthétisent des polymères d'HA de tailles différentes (Itano & Kimata, 2002 ; Stern, 2004 ; Vigetti *et al.*, 2014). Les gènes qui codent pour les hyaluronan synthases sont localisés sur des chromosomes différents : *HAS1* se trouve sur le chromosome 19, *HAS2* sur le chromosome 8 et *HAS3* sur le chromosome 16. Les séquences en acides aminés de ces 3 isoformes présentent un haut degré d'homologie. Ces enzymes sont constituées de 7 domaines transmembranaires dont 2 se trouvent du côté amino-terminal et 5 se trouvent du côté carboxy-terminal. La boucle cytoplasmique formée contient le site catalytique. Ces enzymes de synthèse de l'HA sont des glycosyltransférases qui peuvent prendre en charge à la fois l'acide glucuronique et l'acétylglucosamine. Elles n'ont donc pas besoin de protéines auxiliaires pour les aider dans leur tâche (Itano & Kimata, 2002).

La synthèse de l'HA est régulée dans le temps et dans l'espace. La régulation transcriptionnelle des 3 gènes des hyaluronan synthases varie en fonction du stade de développement et du type de tissu dans lequel ils se trouvent. Elle est également influencée par des facteurs de croissance et des cytokines. Les hyaluronan synthases sont aussi régulées au niveau post-transcriptionnel. Chaque gène est contrôlé individuellement (Itano & Kimata, 2002).

Has1 ne possède pas une forte affinité pour l'acétylglucosamine et l'acide glucuronique, ce qui implique une activité de synthèse de l'HA relativement faible. Cette enzyme génère de l'HA de haut poids moléculaire (Itano & Kimata, 2002 ; Stern, 2004 ; Vigetti *et al.*, 2014). Has1 serait seulement présente dans la moelle épinière durant le développement précoce (Galtrey *et al.*, 2008).

Has2 est l'hyaluronan synthase la plus abondante et la plus active chez l'humain adulte (Vigetti *et al.*, 2014). L'HA de haut poids moléculaire produit par cette enzyme constitue une composante critique pour la MEC lors de l'embryogenèse. En effet, il a été démontré que les embryons HAS2^{-/-} meurent *in utero* tandis que les embryons HAS1^{-/-} ou HAS3^{-/-} sont viables (Itano & Kimata, 2002). Has2 ne serait pas exprimée dans la moelle épinière (Galtrey *et al.*, 2008).

Has3 génère de l'HA de bas poids moléculaire et semble être impliquée dans la formation de microvillosités (Vigetti *et al.*, 2014). De plus, il a été démontré que Has3 est exprimée, dans la moelle épinière, par les neurones possédant des filets périneuronaux. Elle pourrait donc être impliquée dans l'attachement entre ces structures particulières et la membrane plasmique des cellules nerveuses (Galtrey *et al.*, 2008).

○ La dégradation

La capacité de modulation rapide de la quantité d'acide hyaluronique dans un tissu est principalement due à l'activité des hyaluronidases, plutôt qu'à l'activité des hyaluronan synthases (Csoka *et al.*, 2001 ; Stern, 2004). Les hyaluronidases constituent une famille d'enzymes (des hydrolases) qui dégradent l'HA en tétra- et hexasaccharides, mais aussi la chondroïtine et le chondroïtine-sulphate, bien qu'à un rythme plus lent. Il existe 6 séquences hyaluronidase-like dans le génome humain qui partagent 40% d'identité. Celles-ci sont rassemblées au niveau de 2 sites différents sur les chromosomes. *HYAL1*, *HYAL2* et *HYAL3* se situent sur le bras court du chromosome 3 tandis qu'*HYAL4*, *PH-20/SPAM1* (Sperm adhesion molecule 1) et *HYALP1* (Hyaluronidase-like pseudogene) sont localisés sur le bras long du chromosome 7. Cette configuration particulière est probablement due à des phénomènes de duplication successifs. Les deux premières duplications ont résulté en 3 gènes. Elles ont été suivies par une duplication en bloc, ce qui a permis de générer 6 gènes hyaluronidases (Csoka *et al.*, 2001 ; Stern, 2003 ; Stern, 2004).

Hyal-1 est la première hyaluronidase à être isolée à partir de tissus somatiques mammaliens. Cette protéine est active en milieu acide et a un poids moléculaire de 57 kDa. Celui-ci est réparti en deux parties : une chaîne polypeptidique de 49 kDa et une glycosylation post-traductionnelle de 8 kDa. Les niveaux d'ARNm les plus élevés sont retrouvés principalement

dans le foie, les reins, la rate ou encore le cœur. Cette enzyme est également présente dans le plasma (la forme de 57 kDa) et dans l'urine. À cet endroit, Hyal-1 se trouve sous sa forme de 57 kDa ainsi que sous une forme de 45 kDa. Cette dernière est la résultante de deux actions endoprotéolytiques, qui éliminent 99 acides aminés au niveau de l'extrémité carboxy-terminale. Les deux chaînes polypeptidiques restantes sont maintenues entre elles par un pont disulfure (Csoka *et al.*, 2001). La séquence d'*HYAL1* chez la souris est identique à 73% avec celle retrouvée dans le génome humain (Csoka *et al.*, 2001 ; Stern, 2003 ; Stern, 2004).

Hyal-2 est une hyaluronidase, de structure similaire à celle d'Hyal-1, qui est également très exprimée chez l'humain. De même qu'Hyal-1, son activité se manifeste à pH acide. La forme majoritaire de cette hyaluronidase est ancrée dans les membranes plasmiques grâce à une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol). Toutefois, elle peut aussi se trouver sous une forme soluble. Elle agit de concert avec Hyal-1 pour dégrader l'HA de haut poids moléculaire en tétrasaccharides (Csoka *et al.*, 2001 ; Stern, 2003 ; Stern, 2004).

Très peu de choses sont connues à propos d'**Hyal-3**. Toutefois, une étude a démontré qu'elle est fortement exprimée dans les testicules et la moelle osseuse, chez les mammifères. Cette hyaluronidase jouerait un rôle important dans la régulation des cellules souches. Cependant, aucune activité hyaluronidase n'a encore été mise en évidence pour cette protéine. L'Hyal-3 murine possède 80% de similarité avec la séquence en acides aminés humaine (Csoka *et al.*, 2001).

La quatrième hyaluronidase, **Hyal-4** est un pseudogène transcrit mais qui n'est pas traduit chez l'humain (Stern, 2004). Cette enzyme est exprimée dans le placenta et le muscle squelettique. Tout comme Hyal-2, elle est ancrée dans les membranes plasmiques grâce à une ancre GPI. Cette enzyme possède comme particularité de ne pas prendre en charge l'acide hyaluronique. Par contre, elle possède une activité chondroïtinase, tout comme Hyal-1 et la PH-20, en plus de leur activité hyaluronidase. Le chondroïtine sulphate est relativement proche de l'acide hyaluronique. En effet, le N-acétyl-glucosamine retrouvé dans l'HA est remplacé par le N-acétyl-galactosamine dans le chondroïtine sulphate. Chez la souris, la séquence d'Hyal-4 possède 77% de similitude avec la séquence en acides aminés du génome humain (Csoka *et al.*, 2001 ; Stern, 2003).

La PH-20 est une hyaluronidase localisée principalement dans les spermatozoïdes. En effet, cette enzyme joue un rôle important dans la dégradation de la zone pellucide de l'ovocyte ainsi que lors de la fertilisation. Toutefois, elle est également retrouvée dans l'épididyme, le tractus génital femelle, le placenta et les tissus fœtaux. La PH-20 est présente sous deux formes dont l'une est soluble et l'autre est attachée à la membrane plasmique grâce à une ancre GPI. Elle possède 40% de similitude avec l'Hyal-1 (Csoka *et al.*, 2001 ; Stern, 2003).

Enfin, **HYALP1** est un pseudogène retrouvé dans le génome humain. En effet, en raison de la présence d'un codon stop aberrant, ce gène ne peut être traduit. Toutefois, celui-ci code pour une hyaluronidase active chez les souris et d'autres mammifères. L'Hyalp-1 chez la souris et l'humain partagent environ 68% de leur séquence en acides aminés (Csoka *et al.*, 2001 ; Stern, 2003).

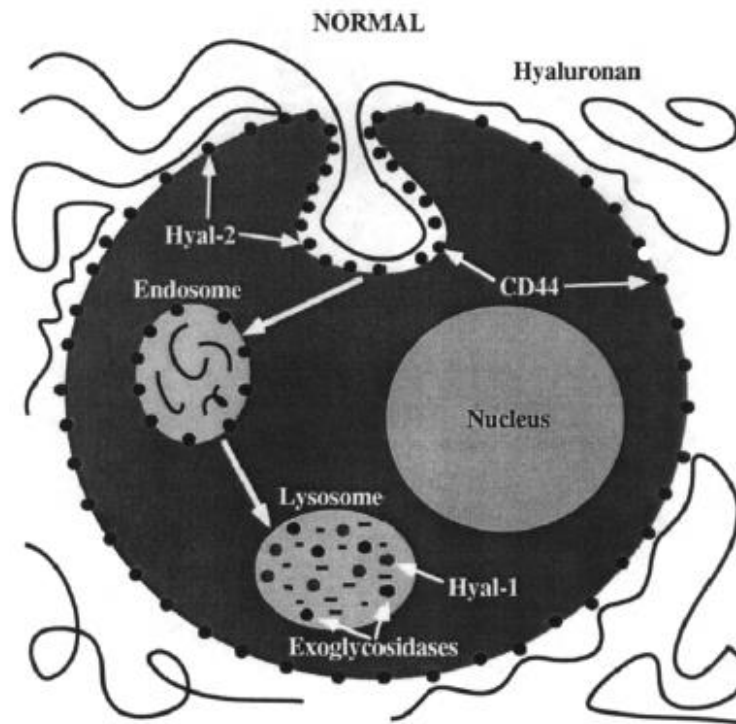


Figure 6 : Dégradation de l'HA : implication d'Hyal-1 et d'Hyal-2 (Csoka *et al.*, 2001)

Hyal-2 est ancrée dans la membrane plasmique des cellules, à proximité du récepteur CD44. Lorsque l'HA de haut poids moléculaire se trouvant dans la MEC se lie à ce dernier, il est dégradé en fragments d'approximativement 20 kDa. Ceux-ci sont internalisés dans des endosomes qui se transforment ensuite en lysosomes. Dans ce milieu acide, Hyal-1 dégrade les fragments d'HA en tétrasaccharides avec l'aide de deux β -exoglycosidases.

Comme mentionné précédemment, une hypothèse a été proposée selon laquelle Hyal-1 et Hyal-2 agiraient ensemble pour dégrader l'acide hyaluronique en tétrasaccharides. En effet, il a été démontré qu'Hyal-2, qui se trouve dans la membrane plasmique externe des cellules, dégrade l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire en fragments d'approximativement 20 kDa (environ 50 disaccharides). Cette première étape de dégradation se réalise avec l'aide d'un récepteur de l'acide hyaluronique (exemple : CD44) se trouvant également en membrane plasmique. Il y a également une interaction avec NHE1 (un échangeur de Na^+ et de H^+), qui crée un microenvironnement acide pour le bon fonctionnement d'Hyal-2. Les fragments d'HA issus de cette première dégradation sont internalisés dans des vésicules d'endocytose avant d'être transférés dans des endosomes. Ensuite, ces derniers se transforment en lysosomes et voient donc leur pH diminuer. À pH bas, l'Hyal-1 peut alors fonctionner et dégrade les fragments d'HA de 20 kDa en tétrasaccharides avant que ceux-ci ne soient séparés en saccharides. Deux β -exoglycosidases interviennent également dans le processus de dégradation de l'HA (dans la phase de dégradation de l'HA de 20 kDa ainsi que dans la phase finale) : la β -glucuronidase et la β -N-acetyl glucosaminidase (Figure 6) (Csoka *et al.*, 2001 ; Stern, 2003 ; Stern, 2004).

Lorsqu'un stress survient, la quantité d'HA augmente très rapidement et très fortement. Pour expliquer ce phénomène, des inhibiteurs d'hyaluronidases seraient impliqués. En effet, de par leurs actions d'inhibition et de dégradation des hyaluronidases, la quantité d'HA peut alors augmenter fortement. Ces inhibiteurs sont synthétisés dans le foie et libérés en réponse à un stress. Ils sont également retrouvés chez les patients atteints d'un cancer. En dépit du rôle capital qu'ils jouent dans la régulation de la quantité d'HA, peu de choses sont connues à leur propos (Stern, 2004).

2.3. Les récepteurs

L'HA est capable de se lier à beaucoup de protéines de la MEC, à des hyaladérines (par exemple : TSG6. Il s'agit de protéines se liant spécifiquement à l'HA) et à des récepteurs de membrane (CD44, RHAMM, HARE, LYVE 1 et les TLRs 2 et 4) afin d'agir sur le développement, la migration cellulaire, l'inflammation, l'apoptose, la survie cellulaire, la prolifération cellulaire et la formation des tumeurs (Fraser, 1997 ; Stern, 2004 ; Vigetti *et al.*, 2014). Certains de ces récepteurs permettent aussi d'ancrer l'HA en surface cellulaire afin d'interagir avec les autres cellules (Fraser, 1997).

2.4. Les fonctions

C'est par l'intermédiaire de multiples interactions avec des récepteurs et des composantes de la MEC que l'HA module le comportement des cellules. Toutefois, le paramètre le plus important dans la signalisation de l'HA est sa taille. Les longues chaînes d'HA ne possèdent pas les mêmes fonctions que l'HA de poids moléculaire inférieur. Pour justifier ce phénomène, une hypothèse a été proposée selon laquelle l'HA de haut poids moléculaire serait capable de regrouper les récepteurs sur la membrane plasmique. En revanche, l'HA de bas poids moléculaire, même en interagissant avec ses récepteurs, n'est pas capable de les rassembler. C'est ce qui expliquerait que ces deux formes d'HA induisent une signalisation cellulaire différente (Vigetti *et al.*, 2014).

○ Rôle dans la MEC

La MEC est constituée de plusieurs molécules ayant des fonctions diverses. Celles-ci entourent les cellules et ce, dans le but d'assurer leur nutrition, l'élimination des déchets, les contacts entre cellules ou entre les cellules et la MEC ainsi que la signalisation. Les glycosaminoglycans font partie des molécules composant la MEC. Comme précisé précédemment, il s'agit de polysaccharides liés à une protéine. L'HA fait partie de la famille des glycosaminoglycans mais, contrairement à ces derniers, il n'est pas sulfaté et n'est pas lié à une protéine (Stern, 2003 ; Vigetti *et al.*, 2014)

L'HA de haut poids moléculaire est une molécule qui permet de remplir l'espace extracellulaire et de jouer le rôle de squelette de la MEC (par interaction avec d'autres composantes de la MEC et des protéines de liaison), d'hydrater les tissus et de réguler la pression osmotique et ce, en raison de sa forte charge négative. Il peut également agir comme un lubrifiant (dans les articulations) et permet d'amortir des chocs. Il possède encore de multiples fonctions : générer des espaces et interagir avec des récepteurs pour favoriser la motilité cellulaire, réduire le nombre de contacts entre les cellules, empêcher la communication intercellulaire et déterminer la perméabilité à certaines substances (Fraser, 1997 ; Itano & Kimata, 2002 ; Stern, 2003 ; Stern, 2004).

○ Rôle dans l'inflammation

L'HA peut avoir diverses fonctions suivant sa taille. En effet, l'HA de haut poids moléculaire inhibe l'angiogenèse. Les vaisseaux sanguins sont incapables d'envahir le cartilage, l'humeur vitrée de l'œil et les articulations étant donné que l'HA de haut poids moléculaire y est présent en grande quantité (Stern, 2004). Il est également anti-inflammatoire et immunosuppresseur. Au contraire, l'HA de poids moléculaire intermédiaire (20 kDa) favorise l'angiogenèse en induisant la prolifération des cellules endothéliales et favorise l'inflammation en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires. En ce qui concerne l'HA de 6 à 20 kDa, ce dernier est capable d'activer les cellules dendritiques en provoquant l'expression de gènes pro-inflammatoires et donc de stimuler le système immunitaire. Enfin, les tétrasaccharides d'HA bloquent la mort cellulaire de par leur propriété anti-apoptotique (Stern, 2003 ; Stern, 2004 ; Khaing *et al.*, 2011 ; Vigetti *et al.*, 2014).

Lors de la survenue d'une blessure, des mécanismes se mettent en place pour guérir la plaie. Dans un premier temps, l'HA de haut poids moléculaire génère des espaces dans le tissu afin de faciliter l'invasion des globules blancs sur le site de l'inflammation. Ceux-ci peuvent alors éliminer le tissu mort, les débris et les bactéries. Durant cette étape, il est nécessaire qu'Hyal-2 soit inhibée. Ensuite, lorsque les inhibiteurs de cette enzyme sont retirés, Hyal-1 est inhibée et l'HA de haut poids moléculaire est découpé. Les fragments induisent alors la production de cytokines inflammatoires et l'angiogenèse est également stimulée (Stern, 2004 ; Vigetti *et al.*, 2014).

2.5. Implication de l'HA dans les lésions de la moelle épinière

Comme il a été décrit précédemment, la MEC du système nerveux central ainsi que les filets périneuronaux sont notamment constitués d'HA. Ce dernier y joue un rôle important de squelette sur lequel d'autres molécules se lient. Dans cet environnement, il a été démontré que l'HA est synthétisé par les neurones et ce, grâce aux hyaluronan synthases (Galtrey *et al.*, 2008).

Une étude a démontré que lorsqu'une lésion de la moelle épinière est induite chez un rat, l'HA de haut poids moléculaire est dégradé en plus petits fragments qui influencent le comportement des astrocytes via le CD44. En effet, après un trauma médullaire, les astrocytes qui s'activent et prolifèrent expriment fortement ce récepteur. Quelques jours après le trauma, de l'HA de haut poids moléculaire est synthétisé à nouveau. Il a été mis en évidence que celui-ci peut inhiber la prolifération astrocytaire en se liant au récepteur CD44 (Struve *et al.*, 2005). C'est pour cette raison que des recherches ont été réalisées afin de déterminer l'effet d'un gel d'HA de haut poids moléculaire chez des rats. Ils ont pu démontrer que lorsque ce gel est inséré à l'endroit de la lésion, il réduit la prolifération et l'activation des astrocytes ainsi que leur production en CSPGs, inhibiteurs de la repousse axonale. Cela permettrait donc d'atténuer la formation de la cicatrice gliale et de favoriser la repousse axonale (Khaing *et al.*, 2011).

3. Objectifs du mémoire

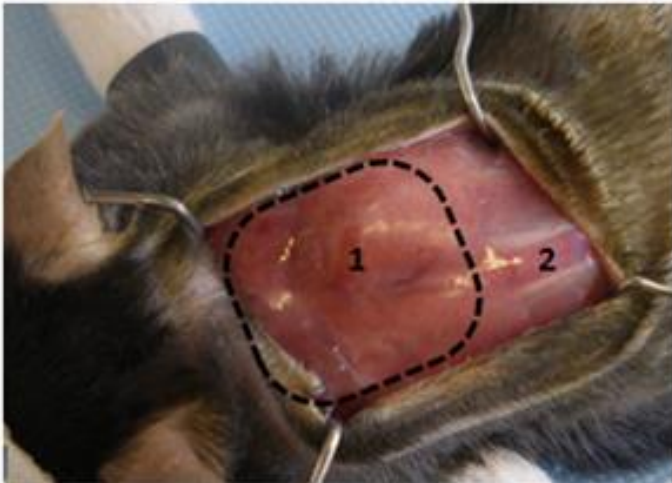
Étant donné qu'il n'existe toujours aucun traitement pour les personnes atteintes de lésions de la moelle épinière, il est capital de mieux comprendre les mécanismes qui entrent en jeu (Kundi & Ahmed, 2013). L'HA étant une molécule localisée dans la MEC du système nerveux central et impliquée dans beaucoup de fonctions, il est intéressant de l'étudier de plus près lorsqu'un trauma médullaire survient. C'est pourquoi ce projet expérimental s'est focalisé principalement sur 3 objectifs:

- 1) Caractériser la distribution spatio-temporelle de l'HA suite une hémisection de la moelle épinière chez des souris.
- 2) Corréler une modulation possible de l'expression ou de la localisation de l'HA se trouvant dans la moelle épinière avec une régulation différentielle des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'HA : les hyaluronan synthases et les hyaluronidases.
- 3) Identifier les cellules productrices d'HA après une hémisection de moelle épinière.

Pour ce faire, un modèle murin d'hémisection médullaire a été utilisé. En effet, contrairement aux humains, les rongeurs récupèrent leur fonction motrice après un trauma de la moelle épinière (Khaing *et al.*, 2011). Bien que les rats soient les plus communément utilisés pour une étude portant sur les traumatismes médullaires, nous avons décidé de travailler avec les souris étant donné qu'il existe de nombreuses similarités entre les lésions de la moelle épinière chez les souris et chez les humains (Kundi & Ahmed, 2013, Sharif-Alhoseini & Rahimi-Movaghar, 2014). De plus, elles constituent un modèle qui permet l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés afin d'explorer la fonction de gènes impliqués dans le métabolisme de l'HA après un

Trauma médullaire expérimental (Par exemple : *HYAL1*^{-/-} et *HYAL2*^{-/-}) (Marques *et al.*, 2009 ; Sharif-Alhoseini & Rahimi-Movaghar, 2014 ; Silva *et al.*, 2014).

MATÉRIEL & MÉTHODES

A**B****Figure 7: Chirurgie des souris**

La peau a été coupée et écartée dans le but de créer une fenêtre chirurgicale. **(A)** La glande hibernante est visible sous la peau du dos (1, entourée par les pointillés). Les tendons des muscles paraspinaux (en blanc) sont également observables (2). **(B)** La glande hibernante (1) est soulevée afin de visualiser le vaisseau sanguin (2, entouré par les pointillés).

Matériel & Méthodes

In vivo

1. Animaux

Le projet a été approuvé par la Commission d'éthique en expérimentation animale (CEEEXPANI, projet éthique 15-239) de l'Université de Namur. Pour les différentes expériences, des souris mâles C57BL6/J de 12 semaines ont été utilisées. Ces souris sont issues des Laboratoires Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) ou de l'élevage interne. La chirurgie a été réalisée au niveau thoracique, entre les 8^{ème} et 9^{ème} vertèbres, ce qui correspond à la zone médullaire T11/T12. Dans le groupe de souris lésées, une hémisection est induite. Par convention, les lésions sont réalisées du côté droit de la moelle épinière. Dans le groupe des souris contrôles, une laminectomie est effectuée.

Les souffrances et le nombre de souris utilisées sont minimisés autant que possible (Voir 3. *Soins post-opératoires*). De plus, les souris ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. Un cycle jour/nuît leur est imposé. Celui-ci consiste en 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité.

2. Procédure chirurgicale

Les souris sont anesthésiées via l'injection intrapéritonéale d'un cocktail de Kétamine 100 mg/kg (Ketamine 1000 Ceva®, Bruxelles, Belgique) et de Xylazine 5 mg/kg (XYL-M® 2%, VMD, Arendonk, Belgique) dilué dans du liquide physiologique. Lorsqu'elles sont endormies, les souris sont rasées afin d'éviter l'entrée de poils dans l'incision durant l'opération. Afin de minimiser la perte de chaleur durant la chirurgie, les animaux sont placés sur une planche isolante. Les opérations sont réalisées sous un microscope Olympus SZX9 et Highlight 2100 (Tokyo, Japon) dans des conditions stériles.

La première étape de l'opération consiste en la réalisation d'une incision médiane de la peau de 1.5 cm à partir du sommet de la courbe du dos en direction de la tête. Ensuite, la fenêtre chirurgicale est élargie et un coussin adipeux, appelé la glande hibernante, est alors observable (Figure 7 A). Cette glande est soulevée afin de localiser le vaisseau sanguin qui résulte de la rencontre de plusieurs petits vaisseaux (Figure 7 B). Celui-ci plonge entre les 4^{ème} et 5^{ème} vertèbres thoraciques chez 81% des animaux et constitue un repère important pour identifier correctement la vertèbre thoracique ciblée (la vertèbre T9) (De Medinaceli, 1986). Pour atteindre la colonne vertébrale, les muscles paraspinaux localisés entre les deux tendons et le vaisseau sanguin sont retirés (Figure 7 A). Ensuite, une laminectomie de la vertèbre T9 est effectuée avec une pince rongeur (Friedman-Pearson Rongeur 0.5 mm Cup Curved, Fine Science Tools, Vancouver, Canada) dans le but d'exposer la moelle épinière. Une hémisection sur le côté droit de la moelle est réalisée sur les souris appartenant au groupe d'animaux lésés. Les souris contrôles subissent une procédure chirurgicale identique, incluant la laminectomie, mais aucune lésion n'est induite. À la fin de la chirurgie, les muscles vertébraux sont suturés et la peau est refermée à l'aide de clips (MikRon® Precision, Inc. Gardena, CA, USA).

3. Soins post-opératoires

Lorsque l'opération est terminée, les souris sont placées dans une cage propre (qui a été préalablement déposée sur un coussin chauffant) jusqu'à ce que les animaux soient totalement réveillés. 1 mL de liquide de Ringer (Baxter, Lessines, Belgique) et 0,05 mg/kg de buprénorphine (Vetergesic® 0.3 mg/mL, Ecuphar, Oostkamp, Belgique) sont injectés respectivement pour éviter la déshydratation et pour assurer le soulagement de la douleur. Ces soins post-opératoires sont réalisés directement, 12 heures et 24 heures après l'opération. Un antibiotique est également injecté chaque jour et ce, durant 5 jours, afin d'éviter l'apparition d'infections. Le premier antibiotique était la céfazoline sodique (Cefazoline SANDOZ® 1g, Bâle, Suisse) avant l'utilisation de l'enrofloxacin 5% (5mg/kg, Baytril®, Bayer, Leverkusen, Allemagne), un antibiotique avec un spectre plus large. Ce traitement commence directement après la chirurgie. Les injections pour le liquide de Ringer, la buprénorphine et l'antibiotique sont sous-cutanées. Un massage de la vessie est effectué deux fois par jour jusqu'à ce que sa fonction soit restaurée. Enfin, l'expérimentateur doit s'assurer du bien-être des animaux chaque jour, les peser et déterminer leur niveau de douleur. Lorsqu'une souris dépasse le niveau de douleur critique, elle est sacrifiée.

4. Traitement des tissus pour l'histologie

4.1. Cryostat

Pour cette expérience, des souris sont sacrifiées deux semaines (Groupe lésé : n=13 ; groupe contrôle : n=13) et six semaines (Groupe lésé : n=5 ; groupe contrôle : n=4) après la chirurgie. Elles sont profondément anesthésiées et subissent une perfusion intracardiaque (machine de perfusion : Thermo Scientific FH15, Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) avec 0.9 % de chlorure de sodium. Ensuite, une solution de paraformaldéhyde 4% (PFA, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) dilué dans 0.1 M de tampon phosphate est injectée dans le but de fixer les organes des animaux. Après, les moelles épinières sont prélevées et préservées toute une nuit dans la PFA 4%. Le lendemain, elles sont transférées dans de l'eau de ville durant 1 heure avant d'être déposées pour quelques jours dans du sucrose 30% (VWR chemicals, Radnor, Pennsylvania, USA) dilué dans du tampon phosphate 0.1 M. Cette étape est importante pour la cryoprotection des échantillons. Les moelles épinières sont ensuite coupées de telle façon à obtenir un segment de 6 mm, avec 3 mm de part et d'autre de l'épicentre de la lésion. Ces morceaux sont enrobés dans de l'OCT (un cryoprotecteur pour éviter la formation de cristaux de glace) (Tissue-Tek®, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Pays-Bas) et congelés à -20°C. Les blocs d'OCT sont coupés à l'aide d'un cryostat (Leica CM 1900, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany), dans le plan transversal des moelles épinières. Les coupes ont une épaisseur de 30 µm et sont récoltées sur des lames SuperFrost + (Thermo Scientific, Menzel-Gläser, Braunschweig, Germany) et séchées durant 1 heure à température ambiante. Cette dernière étape est essentielle pour faire adhérer correctement les coupons de moelles épinières sur les lames. Enfin, les lames sont conservées à -20°C afin d'éviter la dégradation des échantillons.

4.2. Paraffine

Les moelles épinières sont prélevées de la même manière que pour les moelles destinées au cryostat. Elles sont également préservées dans de la PFA 4% durant toute une nuit. Ensuite, elles sont déshydratées durant leur passage dans différents bains de toluol, de méthanol et d'éthanol avant l'inclusion en paraffine. Après, les échantillons sont enrobés dans la paraffine à 60°C. Lorsque la paraffine est durcie par refroidissement, les blocs sont dégrossis au microtome (Leica RM2245, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne). Avant d'être coupés, ils sont transférés dans le Mollifex (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) pendant 2 ou 3 heures dans le but d'obtenir des tissus fixés moins cassants. Des coupons de moelles épinières de 6 µm d'épaisseur peuvent ainsi être générés et déposés sur des lames SuperFrost +. Tous les blocs de paraffine sont coupés entièrement afin de réaliser des analyses histologiques à différentes distances par rapport à l'épicentre. Enfin, les coupons de paraffine collés sur les lames SuperFrost + sont conservés à température ambiante.

4.3. Expériences

○ Coloration Eriochrome C-Crésyl violet

Afin de réaliser des analyses morphologiques et de déterminer les tailles des lésions, une coloration avec l'Eriochrome C (Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA) et une contre-coloration au Crésyl violet (Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA) sont réalisées sur des coupons de moelles épinières.

Les lames sur lesquelles se trouvent les coupons de moelles épinières coupés au cryostat sont décongelées et séchées durant 2 heures à température ambiante. Afin d'améliorer l'adhérence des coupons sur les lames, celles-ci sont chauffées dans un four à 48°C, pendant 30 minutes. Ensuite, les lames sont immergées dans de l'eau distillée, du toluol, du méthanol 100%, du méthanol 95%, du méthanol 70% et dans de l'eau de ville. Après ces différents bains, les lames sont transférées dans l'Eriochrome C durant 2 minutes avant la différenciation dans l'hydroxyde d'ammonium pendant 7 minutes. Après un rapide rinçage, une contre-coloration avec du Crésyl violet 0.4% est réalisée pendant 1 minute. La différenciation du Crésyl violet nécessite des bains consécutifs d'éthanol 70%, d'éthanol 95%, d'éthanol 100% et de toluène. Les lames sont ensuite montées avec du DPX (VWR, Radnor, Pennsylvanie, USA).

En ce qui concerne la coloration des coupons enrobés en paraffine, le protocole est quelque peu différent. Les lames sont séchées et déparaffinées dans différents bains de toluol, de méthanol et d'eau courante. Ensuite, elles sont immergées dans l'Eriochrome C durant 30 minutes et rincées dans de l'eau distillée avant la différenciation dans l'hydroxyde d'ammonium durant 4 minutes. La contre-coloration est effectuée avec du Crésyl violet 1% pendant 1 heure. La différenciation du Crésyl violet est identique à celle pour les coupons obtenus avec le cryostat. Les lames sont également montées avec le DPX.

Les images des lésions sont analysées et quantifiées avec le programme ImageJ. Afin de déterminer le rapport de la zone lésée dans une demi-moelle épinière, la surface lésée est entourée et comparée à la surface totale de l'autre moitié de la moelle, qui est contralatérale

	Composition	Firme
Produits du Vector® M.O.M.™ Kit		
M.O.M.™ Mouse IgG Blocking Reagent	90 µL de la solution stock + 2.5 mL de TBS	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
M.O.M.™ Diluent	600 µL de la solution stock + 7.5 mL de TBS	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
M.O.M.™ Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent	10 µL de la solution stock + 2.5 mL de M.O.M.™ Diluent	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Autres produits		
Peroxyde d'hydrogène 3%	Peroxyde d'hydrogène dilué dans de l'eau distillée	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
TBS	6g de Tris-HCl + 45g de NaCl dilués dans de l'eau distillée	
Mix Streptavidine-peroxydase	Solution A 1/100 et Solution B 1/100 diluées dans le TBS	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Diaminobenzidine (DAB)	1 goutte de DAB + 1 mL de tampon	Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA
Anticorps primaire		
Anti-GFAP 1/100	Source : souris	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA

Tableau 1: Produits et anticorps nécessaires pour le marquage immunohistochimique de la GFAP.

par rapport au côté de la lésion. L'épicentre de la lésion est défini arbitrairement au niveau du coupon avec le rapport de surface lésée le plus élevé. Le volume de chaque lésion est également déterminé grâce à l'estimateur de volume de Cavalieri, avec la formule : $V = [\Sigma (A_1 + A_2 + \dots A_n) \times D] - [A_{\max} \times Y]$, dans laquelle A est la surface de la lésion, D est la distance entre chaque coupon analysé (150 μm) et Y représente l'épaisseur des coupons (30 μm) (Li et al, 2014).

○ *Marquage immunohistochimique de la GFAP*

La GFAP (marqueur des astrocytes) est marquée sur des coupons de moelles épinières enrobés en paraffine en suivant le protocole du Vector[®] M.O.M.[™] Kit. Ce kit permet de diminuer le bruit de fond lorsqu'un marquage nécessite l'utilisation d'un anticorps primaire de souris sur un tissu de souris. Un contrôle positif et un contrôle négatif ont été réalisés. Le premier est une coupe de cerveau de rat et le deuxième est une coupe de moelle épinière sur laquelle l'anticorps primaire n'est pas ajouté.

La première étape est le déparaffinage des lames. Celui-ci nécessite des bains successifs de toluène, de méthanol 100% et de méthanol 70%. Ensuite, les lames sont blanchies dans de l'eau de ville pendant 10 minutes, avant de réaliser le démasquage. Pour ce faire, les coupons sont immergés 10 minutes dans du tampon citrate préchauffé à 100°C. Ensuite, ils sont rincés dans de l'eau distillée, puis plongés 10 minutes dans du peroxyde d'hydrogène 3% et ce, dans le but de saturer la peroxydase endogène. Après un rinçage au TBS, le M.O.M.[™] Mouse IgG Blocking Reagent est ajouté sur les coupons de moelles épinières durant 1 heure. L'anticorps primaire dilué dans le M.O.M.[™] Diluent est ajouté après un bref rinçage. L'incubation de cet anticorps dure une nuit. Après un lavage, les lames sont incubées 10 minutes avec le M.O.M.[™] Biotinylated Anti-Mouse IgG Reagent. Le mix Streptavidine-peroxydase est ajouté pendant 45 minutes, après un rinçage. Suite à un ultime lavage de TBS, la révélation avec la diaminobenzidine est effectuée. Enfin, les coupons de moelles épinières sont contre-colorés avec l'hémalum, déshydratés et les lames sont montées au DPX (Tableau 1).

○ *Marquage de l'HA à l'aide de l'HABP.*

Afin de détecter et de localiser l'HA dans les moelles épinières contrôles et lésées enrobées en paraffine, un marquage est effectué à l'aide d'une peroxydase. L'HABP, une protéine de liaison de l'HA, est utilisée pour mettre ce dernier en évidence. Une coupe de peau de souris a été utilisée comme contrôle positif et une coupe de moelle épinière sur laquelle l'anticorps primaire n'a pas été ajouté constitue le contrôle négatif.

Les premières étapes consistent à déparaffiner les lames (en passant dans des bains de toluol, de méthanol et d'eau courante), les laver avec du PBS (Phosphate Buffer Saline) et les plonger dans 3 bains successifs de 0.1 M de glycine. Un nouveau rinçage est réalisé avec du PBS avant l'immersion, pendant 10 minutes, des lames dans le peroxyde d'hydrogène 3%. Les échantillons sont saturés avec le PBS-0.2% BSA- 0.1% Triton durant 1 heure à température ambiante, après 3 rinçages au PBS. L'incubation des lames avec la protéine de liaison à l'HA (b-TGS6 ou Calbio) diluée dans le PBS-0.2% BSA- 0.1% Triton est réalisée

	Composition	Firme
Produits		
Glycine 0.1 M	Glycine diluée dans de l'eau distillée	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Peroxyde d'hydrogène 3%	Peroxyde d'hydrogène dilué dans de l'eau distillée	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
PBS-0.2% BSA- 0.1% Triton	/	BSA : Amresco, Solon, OH, USA ; Triton : Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mix Streptavidine-peroxydase	Solution A 1/100 et Solution B 1/100 diluées dans du PBS	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
Diaminobenzidine (DAB)	1 goutte de DAB + 1 mL de tampon	Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA
Protéines de liaison à l'HA		
b-TGS6 1/500	/	Halozyne Therapeutics, San Diego, CA, USA
Calbio 1/100	/	Calbiochem, EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA

Tableau 2: Produits et protéines de liaison à l'HA nécessaires pour le marquage histochimique de l'HA.

	Composition	Firme
Produits		
Glycine 0.1 M	Glycine diluée dans de l'eau distillée	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PBS-0.2% BSA- 0.02% Triton	/	BSA : Amresco, Solon, OH, USA ; Triton : Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hoechst 33258 1/100	Hoechst dilué dans le PBS-0.2%BSA-0.02%	Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA
Mowiol	/	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
Anticorps primaires		
Anti-GFAP 1/100	Source : souris	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
Anti-Iba1 1/100	Source : lapin	Wako Chemicals GmbH, Neuss, Allemagne
Protéine de liaison à l'HA		
b-TGS6 1/500	/	Halozyne Therapeutics, San Diego, CA, USA
Anticorps secondaires		
Anti-souris-Alexa 594 1/100 (GFAP)	Source : chèvre	Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA
Anti-lapin-Alexa 594 1/100 (Iba1)	Source : chèvre	Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA
Streptavidine FITC 1/500	/	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA

Tableau 3: Produits et anticorps nécessaires pour le double marquage fluorescent.

durant toute une nuit, dans une chambre humide à 4°C. Lorsque les lames sont rincées avec le PBS, le mix Streptavidine-peroxydase est ajouté pendant 45 minutes, à température ambiante. Un dernier lavage des lames est nécessaire avant la révélation avec la diaminobenzidine. Enfin, avant la déshydratation et le montage au DPX, les coupons de moelles épinières sont contre-colorés à l'hémalun (Tableau 2).

○ *Double marquage fluorescent*

Afin d'étudier une éventuelle co-localisation entre l'HA et la GFAP ainsi qu'entre l'HA et Iba1 (marqueur de la microglie), des doubles marquages fluorescents sont réalisés. Une coupe de cerveau de rat a été utilisée comme contrôle positif et une coupe de moelle épinière sur laquelle les anticorps primaires n'ont pas été ajoutés constitue le contrôle négatif.

La première étape nécessite le déparaffinage des coupons et ce, en immergeant les lames dans des bains successifs de toluène et d'alcool avant le blanchiment à l'eau courante. Un rinçage dans le PBS est nécessaire ainsi que 3 bains de glycine 0.1M et un rinçage au PBS-0.2%BSA-0.02%Triton. Ensuite, les échantillons sont saturés avec le PBS-0.2%BSA-0.02%Triton durant 1 heure à température ambiante. La prochaine étape consiste en l'incubation des lames toute une nuit, dans une chambre humide et à 4°C avec l'anticorps primaire. Il s'agit d'un anticorps anti-GFAP ou d'un anticorps anti-Iba1 mélangé avec la b-TGS6. Tous ces anticorps sont dilués dans du PBS-0.2%BSA-0.02% Triton. Un nouveau lavage avec cette dernière solution est nécessaire avant l'incubation avec les anticorps secondaires durant 1 heure dans une chambre humide à 4°C et ce, dans l'obscurité. En ce qui concerne l'HA, une streptavidine FITC (isothiocyanate de fluorescéine) est ajoutée pour la reconnaissance de la biotine liée à la b-TSG6. Ensuite, les lames sont rincées et les noyaux sont mis en évidence avec le Hoechst 33258 et ce, durant 15 minutes. Finalement, un dernier lavage est réalisé avec le PBS-0.2%BSA-0.02% Triton avant de monter les lames au Mowiol (Tableau 3).

5. Dosage HA (ELISA-like)

5.1. Préparation des échantillons

Afin de déterminer la quantité d'HA se trouvant dans les moelles épinières intactes et lésées, un test similaire au principe de l'ELISA est réalisé. Ce test est appelé ELISA-like en raison du fait que le principe de la technique se base sur la reconnaissance de l'HA par de l'aggrégan et non sur la reconnaissance entre un antigène et un anticorps.

Pour cette expérience, des souris sont sacrifiées deux semaines (Groupe lésé : n=8 ; groupe contrôle : n=5) et six semaines (Groupe lésé : n=5 ; groupe contrôle : n=5) après la chirurgie. Elles sont anesthésiées profondément et subissent une perfusion intracardiaque avec du chlorure de sodium 0.9% glacé. Les moelles épinières sont ensuite prélevées et découpées en 5 segments de 4 mm. Le premier morceau retiré consiste en 2 mm de chaque côté de l'épicentre de la lésion (pour les souris contrôles, l'épicentre est fixé arbitrairement à l'endroit où a eu lieu la laminectomie). Les fragments suivants sont situés directement au niveau rostral ou caudal par rapport au premier morceau. Les derniers segments sont le « rostral + 1 » (directement rostral à la pièce « rostrale ») et le « caudal +1 » (directement caudal à la pièce

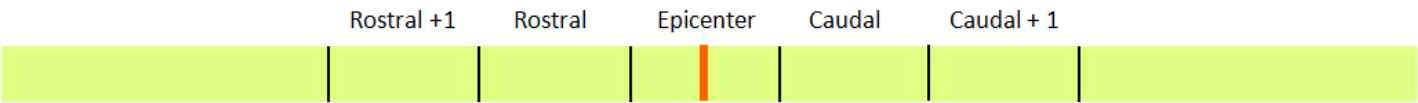


Figure 8: Génération des segments de moelles épinières pour l’ELISA-like et la PCR quantitative.

La bande verte représente la moelle épinière d’une souris. La barre orange représente l’épicentre de la lésion, normalement localisée dans la zone médullaire T11/T12. Les barres noires représentent les délimitations de chaque portion. La moelle épinière est découpée en 5 segments de 4 mm. Le premier morceau retiré consiste en 2 mm de chaque côté de l’épicentre de la lésion (pour les souris contrôles, l’épicentre est fixé arbitrairement à l’endroit où a eu lieu la laminectomie). Les fragments suivants sont situés directement au niveau rostral ou caudal par rapport au premier morceau. Les derniers segments sont le « rostral + 1 » (directement rostral à la pièce « rostrale ») et le « caudal +1 » (directement caudal à la pièce caudale).

	Composition	Firme
Produits du kit R&D Systems		
Capture Reagent	Aggrécan	R&D Systems, Abington, UK
Standards	Différentes concentrations d'HA	R&D Systems, Abington, UK
Solution de révélation	20 µL de Detection Reagent + 5 mL de Reagent Diluent	Detection Reagent : R&D Systems, Abington, UK
Solution substrat	1:1 solution A et B	R&D Systems, Abington, UK
Autres produits		
Tampon de lavage	500 mL de PBS + 250 µL de Tween 20	Tween 20 : Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tampon de blocage	1.5 mL de Tween 20 + 15 µg de NaN3 + 28.5 mL de PBS	NaN3
Reagent Diluent	30 mL de PBS + 1.5 mL de Tween 20	/
Solution Stop	2N H2SO4	/

Tableau 4: Produits nécessaires pour le dosage de l’HA.

caudale) (Figure 8). Chaque segment est déposé individuellement dans un tube et conservé à -80°C.

Une procédure de lyophilisation est nécessaire avant de réaliser le dosage. Pour ce faire, les échantillons congelés à -80°C sont placés dans le lyophilisateur pendant 24 heures. Les tissus secs sont ensuite pesés et une pronase (Protease from *Streptomyces griseus*, Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA) est ajoutée, dans le but de digérer les échantillons. Après, les tubes sont incubés dans le four à 55°C et ce, pendant 24 heures. La pronase est inactivée en chauffant les tubes à 100°C pendant 15 minutes. Enfin, les échantillons sont replacés à -80°C jusqu'à la réalisation du dosage.

5.2. Protocole du dosage

Le dosage a été effectué en suivant le protocole du kit de R&D Systems (Tableau 4). Tout d'abord, la plaque de dosage 96 puits (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Autriche) est recouverte avec de l'aggrécane dilué dans du PBS. Il s'agit d'un protéoglycane qui est reconnu par l'HA. Après une incubation durant toute une nuit, la plaque est lavée avec un tampon de lavage. Ensuite, une étape de blocage est réalisée pendant 1 heure, à température ambiante. Après un second lavage, les échantillons (au préalable resuspendus dans 100 µL d'eau distillée) ainsi que les standards (servant de contrôles positifs) dilués dans le Reagent Diluent sont ajoutés. Les standards sont dilués de 3 en 3, avec une concentration initiale d'HA de 90 ng/mL. Un nouveau rinçage est nécessaire avant l'incubation de 2 heures avec la solution de révélation. Après un lavage, une streptavidine-peroxydase diluée dans le Reagent Diluent est ajoutée durant 20 minutes. Enfin, après un dernier rinçage, la solution substrat est déposée pendant 20 minutes avant d'ajouter la solution stop. La plaque de dosage est ensuite lue au spectrophotomètre (VERSAmax microplate reader, Molecular Devices, Berkshire, UK) à 450 et 570 nm (Tableau 4).

Les valeurs d'absorbance obtenues à 570 nm sont soustraites à celles obtenues à 450 nm. Les valeurs d'absorbance qui correspondent aux standards permettent de réaliser une courbe d'étalonnage. Cette dernière permet de déterminer les concentrations en HA dans les différents échantillons. Enfin, les concentrations sont normalisées par rapport au poids des segments de moelles épinières récoltés.

6. Analyse de l'expression des ARNm par qRT-PCR

6.1. Préparation des échantillons

Pour l'étude de l'expression des gènes des hyaluronan synthases ainsi que des hyaluronidases à différents moments après le trauma médullaire, des morceaux de moelles épinières sont récoltés, de part et d'autre de l'épicentre de la lésion. Dans ce but, des souris sont sacrifiées (par perfusion intracardiaque avec du chlorure de sodium 0.9% glacé) deux semaines (Groupe lésé : n=5 ; groupe contrôle : n=5) et six semaines (Groupe lésé : n=5 ; groupe contrôle : n=5) après la chirurgie. Après leur prélèvement, les moelles épinières sont découpées en 5 segments de 4 mm (Voir point 5.1.). Chaque segment est déposé individuellement dans un tube et conservé à -80°C pour éviter la dégradation des ARNs présents dans le tissu.

	Composition	Firme
Produit du High Pure RNA Tissue Kit		
Dnase	90 µL Dnase incubation buffer + 10 µL Dnase I	Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne
Tampons de lavage	Wash buffer I et II	Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne
Tampon d'élution	/	Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne
Autres produits		
Trizol	/	Ambion, Life technologies, Eugene, OR, USA
Chloroforme	/	VWR Chemicals, Radnor, Pennsylvanie, USA

Tableau 5: Produits nécessaires pour l'extraction de l'ARN présent dans les moelles épinières.

	Firme
Produits du kit Invitrogen	
PolydT 0.5 µg/µL	Invitrogen, Carlsbad, USA
dNTP (désoxy-nucléotides tri-phosphate) 10 mM	Invitrogen, Carlsbad, USA
First strand buffer 5X	Invitrogen, Carlsbad, USA
DDT (Dithiothréitol) 0.1M	Invitrogen, Carlsbad, USA
Reverse Transcriptase : SuperScript II RNase H reverse transcriptase 200 U/µL	Invitrogen, Carlsbad, USA

Tableau 6 : Produits nécessaires pour la reverse transcription (Kit Invitrogen).

6.2. Extraction d'ARN

Tout d'abord, il est important que la manipulation se réalise dans des conditions RNAses-free afin d'éviter la dégradation des ARNs. La première étape dans l'extraction d'ARN consiste en l'ajout de 1 mL de Trizol dans tous les tubes contenant un morceau de moelle épinière. Les échantillons sont ensuite homogénéisés à l'aide d'un MagNA Lyser Instrument (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, une centrifugation (13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C) est nécessaire afin de séparer les différents constituants. Le surnageant de chaque tube est alors récupéré et transféré dans un eppendorf propre et 200 µL de chloroforme sont ajoutés dans chacun d'eux. Les tubes sont ensuite vortexés vigoureusement durant 15 secondes avant d'être incubés 2 à 3 minutes à température ambiante. Une nouvelle centrifugation à 13 000 rpm est réalisée pendant 15 minutes à 4°C. 300-350 µL du surnageant sont transférés dans de nouveaux tubes propres et un volume égal d'éthanol 70% est déposé. Les 700 µL du mélange sont transférés sur chaque colonne ROCHE correspondante accompagnée de son tube collecteur. Celles-ci sont ensuite centrifugées 30 secondes à 13 000 rpm avant de jeter le contenu du tube collecteur. 100 µL de DNase sont déposés sur les colonnes avant d'incuber 15 minutes à température ambiante. Après, les colonnes sont lavées avec des tampons de lavage successifs et sont centrifugées entre chaque lavage. 100 µL de tampon d'élution sont ajoutés sur les colonnes après que ces dernières aient été placées sur de nouveaux tubes eppendorfs. L'ARN de chaque échantillon est récolté dans le tube correspondant après une ultime centrifugation. Le dosage des ARNs est ensuite réalisé avec le nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Rockford, USA). Pour ce faire, 2 µL de chaque échantillon sont déposés. Pour le calibrage de la machine, une goutte de 2 µL d'eau RNase-free est ajoutée. Enfin, les échantillons sont conservés à -80°C (Tableau 5).

6.3. Reverse transcription

La reverse transcription nécessite l'utilisation du kit de Invitrogen (Tableau 6). La première étape à réaliser, avant de commencer la reverse transcription, est de diluer les échantillons dosés au nanodrop dans de l'eau RNase-free de telle façon à obtenir un volume de 12 µL et une concentration identique pour chacun d'eux. Ensuite, un premier mix est préparé. Celui-ci est composé de 0.1 µL de polydT, 1 µL de dNTP et de 0.9 µL d'eau RNase-free par échantillon. 2 µL de ce mix sont déposés sur chaque échantillon. Ceux-ci sont ensuite incubés à 65°C pendant 5 minutes dans le Thermocycler (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems, CA, USA) et ce, dans le but d'hybrider les polydT aux queues polyA des ARN messagers (ARNm). Lorsque les tubes sont refroidis, 7 µL du deuxième mix sont ajoutés dans chacun d'eux. Ce dernier est composé de 4 µL de first strand buffer 5X, 2 µL de DDT, 0.1 µL de reverse transcriptase et 0.9 µL d'eau RNase-free par échantillon. Ensuite, la rétro-transcription des ARNm en ADNc est réalisée durant l'étape de 50 minutes à 42 °C dans le Thermocycler. Enfin, la reverse transcriptase est inactivée au cours d'une dernière étape de 15 minutes à 70°C. Après centrifugation des échantillons, les ADNc sont dilués 20X dans de l'eau RNase-free et conservés à -20°C.

	Séquences des primers (5'-3')	Taille des fragments amplifiés
Gène de référence		
HPRT NM_013556	Primer sens : CCAACAACAAACTTGTCTGGAA Primer anti-sens : GGACCTCTCGAAGTGTGGAT	70 pdb
Gènes d'intérêt		
HYAL 1 NM_008317	Primer sens : TGCCCGTAATGCCCTACGT Primer anti-sens : GCTGTGCTCCAGTTCCTCCA	77 pdb
HYAL 2 NM_010489	Primer sens : TTCTTGAGGTATTGGCAGGTCT Primer anti-sens : AGCCAGGTGGACCTTATCTCTA	119 pdb
HAS 1 NM_008215	Primer sens : CAAGACGGAGAAGAGAGAATCC Primer anti-sens : CTGAGGGCTTTGGCATGT	66 pdb
HAS 3 NM_008217	Primer sens : GATGTCCAAATCCTCAACAAG Primer anti-sens : CCCACTAATACATTGCACAC	126 pdb

Tableau 7 : Séquences des primers sens et anti-sens pour la PCR quantitative.

Programme LightCycler96	Description
Pré-incubation	95°C pendant 600 secondes
Amplification en 2 étapes	95°C pendant 10 secondes 52°C pendant 30 secondes
Melting	95°C pendant 10 secondes 65°C pendant 60 secondes 97°C pendant 1 seconde
Refroidissement	37°C pendant 30 secondes

Tableau 8 : Programme utilisé pour la PCR quantitative (LightCycler96).

6.4. PCR quantitative

Pour la PCR quantitative, un mix pour le gène d'intérêt et un mix pour le gène de référence (HPRT) sont réalisés. Chaque puit de la plaque PCR doit être rempli par 15 μ L de l'un des mix : 10 μ L de SyberGreen (agent intercalant, Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne), 2.5 μ L de primer sens et 2.5 μ L de primer anti-sens (Tableau 7) (Eurogentec, Liège, Belgique) du gène à amplifier. Ensuite, 5 μ L d'ADNc sont déposés dans les puits de la plaque PCR. Afin de réaliser un contrôle négatif, 5 μ L d'eau RNase-free sont ajoutés dans l'un des puits contenant le mélange de primers et de SyberGreen. La plaque est ensuite centrifugée à température ambiante durant 3 minutes à 12 000 rpm avant d'être placée dans le LightCycler96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne) (Tableau 8). L'amplification de l'ADNc peut donc avoir lieu.

Lorsque le LightCycler96 a terminé sa tâche, les données peuvent être analysées. Pour ce faire, le nombre de Cq (cycle quantify) est calculé dans chaque échantillon pour le gène d'intérêt. Ce Cq correspond au nombre de cycles PCR nécessaires pour que le gène d'intérêt sorte du bruit de fond, c'est-à-dire pour qu'il atteigne le niveau de fluorescence seuil déterminé par le programme du LightCycler96. Cela signifie qu'au plus le gène est exprimé, au plus le Cq sera petit. La détection de l'ADNc est permise grâce au SybrGreen. Il s'agit d'une molécule qui se lie sur l'ADN double brin et qui fluoresce lorsqu'elle est fixée.

Le nombre de Cq pour le gène de référence est également important. En effet, celui-ci permet de normaliser le nombre de Cq des autres gènes puisqu'il est exprimé de la même manière dans les différentes conditions étudiées. Pour ce faire, le Δ Cq est calculé. Il s'agit de la différence entre le nombre de Cq du gène d'intérêt et le nombre de Cq du gène de référence. Ensuite, il faut déterminer le $\Delta\Delta$ Cq, qui correspond à la différence entre le Δ Cq du gène d'intérêt pour la condition étudiée (hémisection) et le Δ Cq de la condition contrôle (laminectomie). Enfin, ce $\Delta\Delta$ Cq en valeur négative est élevé à la puissance 2. Cela permet d'obtenir l'expression relative de l'ARNm d'un gène.

7. Évaluation fonctionnelle des animaux

7.1. Basso Mouse Scale (BMS)

La BMS est une échelle qui permet de déterminer le niveau de la récupération motrice des souris après la chirurgie. La BMS utilise des scores qui vont de 0 à 9 et qui déterminent les différentes phases de la récupération motrice des animaux. Les scores de 0 à 2 sont dédiés à l'évolution du mouvement de la cheville des pattes postérieures, qui devient de plus en plus large au plus le score augmente. Ensuite, la seconde phase de récupération correspond au placement plantaire des pattes (scores 3-4). Enfin, les scores de 5 à 8 sont consacrés à la position et la coordination des pattes ainsi qu'à la stabilité du tronc. Enfin, le score de 9 désigne un animal qui a récupéré totalement de l'opération, c'est-à-dire avec une mobilité normale (Figure 9) (Basso *et al.*, 2006).

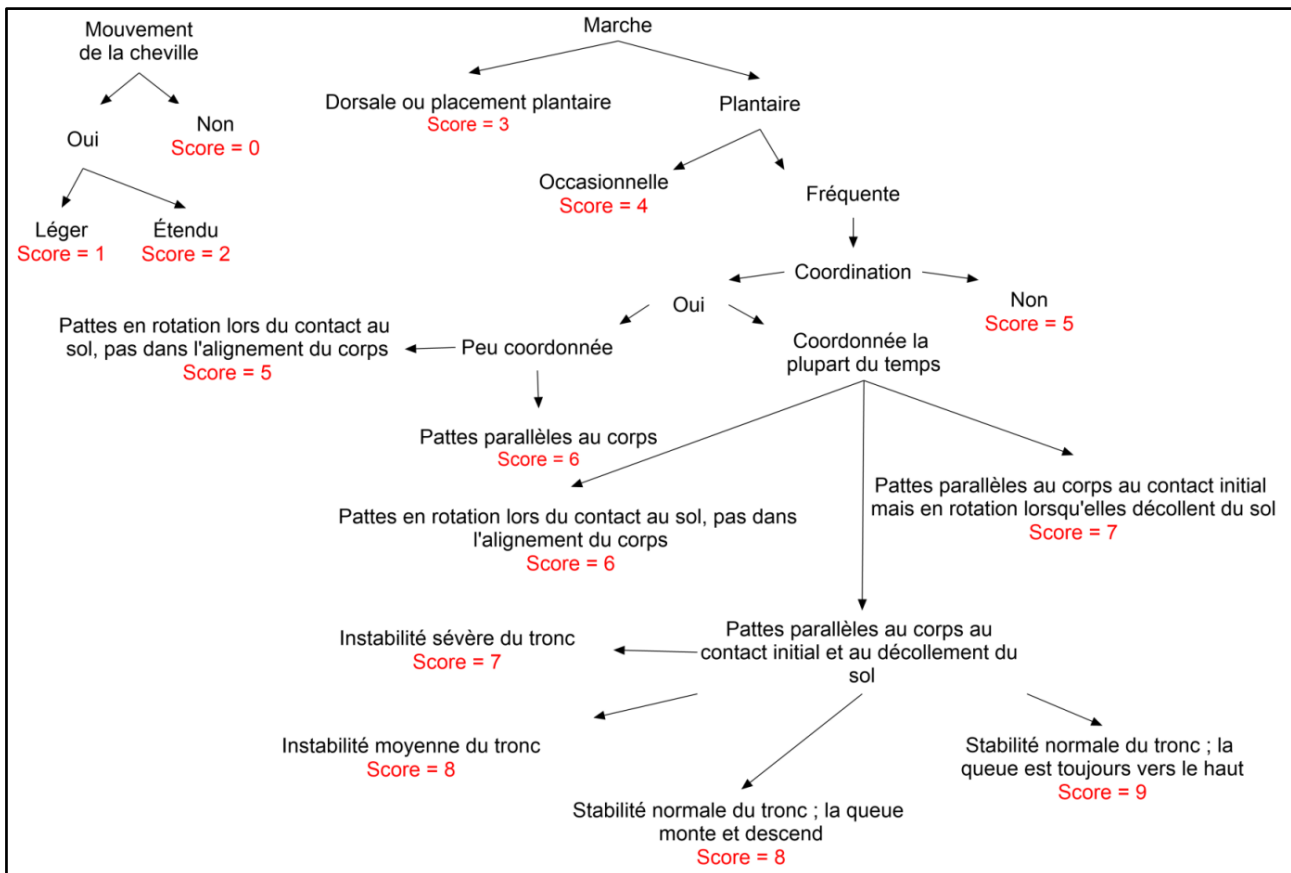


Figure 9 : BMS

La BMS utilise des scores qui vont de 0 à 9 et qui déterminent les différentes phases de la récupération motrice des animaux. Les scores de 0 à 2 sont dédiés à l'évolution du mouvement de la cheville des pattes postérieures. Ensuite, la seconde phase de récupération correspond au placement plantaire des pattes (scores 3-4). Enfin, les scores de 5 à 8 sont consacrés à la position et la coordination des pattes ainsi qu'à la stabilité du tronc. Le score de 9 désigne un animal qui a récupéré totalement de l'opération, c'est-à-dire avec une mobilité normale.

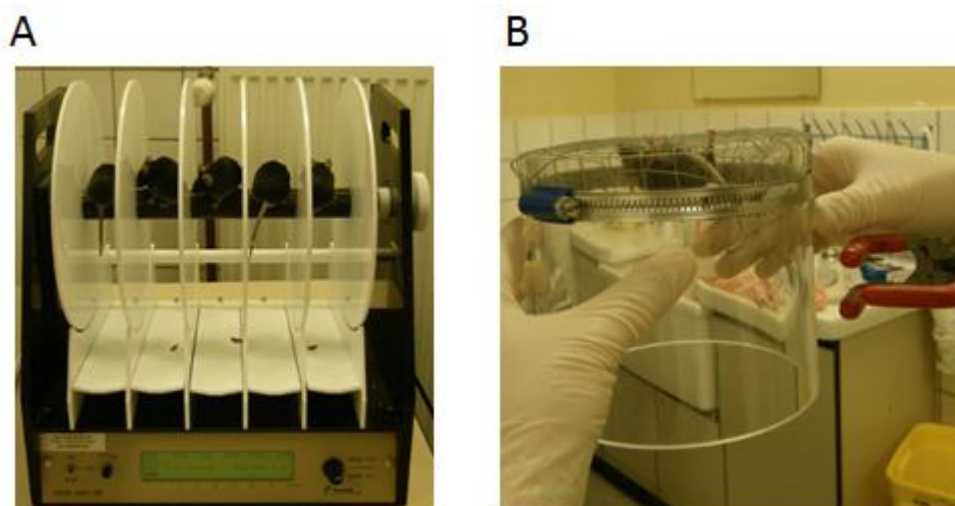


Figure 10: Le Rotarod et le Hanging Wire.

Les souris 6 semaines (hémisections et laminectomies) réalisent des tests comportementaux afin d'évaluer leur récupération motrice après la chirurgie. **(A)** Le Rotarod consiste en un cylindre qui tourne à des vitesses de plus en plus importantes (4 à 40 rotations par minute). **(B)** Pour le Hanging wire, les souris s'agrippent à une grille renversée. Elles sont maintenues à 30 cm du sol.

7.2. Rotarod et Hanging Wire

Les souris conservées jusqu'à 2 semaines après l'opération ne réalisent pas de tests comportementaux. Par conséquent, la récupération après la chirurgie est évaluée selon leur façon de se déplacer. Les souris ayant subi une laminectomie se déplacent normalement dès le lendemain de l'opération. Au contraire, les souris lésées sont incapables de mouvoir leur patte arrière droite (ipsilatérale à la lésion médullaire) durant quelques jours. La récupération totale de ces souris est fixée arbitrairement lorsqu'elles sont à nouveau capables d'utiliser leur patte arrière droite correctement.

En revanche, les souris conservées jusqu'à 6 semaines après l'opération sont soumises à différents tests comportementaux afin de déterminer plus précisément leur récupération motrice. Les tests ne sont pas toujours réalisés dans le même ordre et ce, afin d'éviter l'apparition du phénomène d'habituation. De plus, les tests sont toujours réalisés par le même manipulateur de manière à obtenir des valeurs les plus constantes possible.

○ *Rotarod*

Le Rota-Rod/RS (Panlab, Barcelone, Espagne) est un test utilisé pour vérifier l'équilibre et la coordination motrice des animaux. Les souris sont placées sur un cylindre qui tourne à des vitesses de plus en plus importantes (4 à 40 rotations par minute) (Figure 10 A). Le temps durant lequel les souris se maintiennent sur le rotarod est mesuré. Chaque session consiste en trois essais. Au préalable, ce test nécessite deux semaines d'entraînement avant l'opération. La première semaine, l'entraînement se réalise une fois par jour et ce, durant cinq jours. La deuxième semaine d'entraînement consiste en deux sessions de Rotarod. Après la chirurgie, les souris récupèrent durant une semaine. Afin d'évaluer leur récupération motrice, elles recommencent le test une fois par semaine et ce, jusqu'au moment du sacrifice.

○ *Hanging wire*

Le Hanging wire est un test dans lequel les souris sont suspendues à un grillage retourné. Ce grillage doit se trouver à 30 cm de haut au minimum, afin d'éviter que les souris ne remarquent le sol et se laissent tomber. Le temps mis par les souris avant de lâcher prise est mesuré (Figure 10 B). Le temps d'attente maximal est fixé arbitrairement à 1 minute. Ce test ne nécessite pas d'entraînement au préalable. De la même manière que pour le Rotarod, les souris bénéficient d'une semaine de récupération après la chirurgie avant de commencer le Hanging Wire. Ce test est réalisé une fois par semaine et ce, jusqu'au moment du sacrifice. Chaque session consiste en trois essais.

In vitro

1. Culture des précurseurs des cellules gliales

1.1. Coating des flasks de culture

Tout d'abord, la Poly-L-Lysine est ajoutée dans des flasks. Afin d'éviter toute contamination, ces dernières sont emballées avant d'être incubées à 4°C overnight. Ensuite, la solution de Poly-L-Lysine est aspirée et les flasks sont rincées avec du PBS. Après, la

	Firme
Matériel nécessaire	
Poly-L-Lysine 15 µg/mL	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
Flasks	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Allemagne
Laminine 15 µg/mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Milieu HBSS	

Tableau 9 : Matériel nécessaire pour coater les flasks.

	Firme
Composition du Rodent GRP Basal Medium	
Milieu DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
BSA 0.1 %	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
B-27	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pénicilline/Streptomycine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Cellules	
Glial-Restricted Precursor Cells (GRP)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Autres produits	
FGF-2 10 ng/mL	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
Trypsine/EDTA 0.05%	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Tableau 10 : Matériel nécessaire pour la culture des précurseurs gliaux.

laminine est ajoutée. Après une incubation de 2 heures à 37°C, cette solution de laminine est aspirée et les flasks sont lavées à nouveau avec du PBS. Enfin, après l'ajout du milieu HBSS pour éviter leur assèchement, elles peuvent être conservées à 4°C (Tableau 9).

1.2. Culture des précurseurs gliaux

Pour commencer, le milieu (Rodent GRP Basal Medium) est chauffé et un cryotube est retiré de l'azote liquide avant d'être réchauffé au bain-marie à 37°C. Ensuite, les précurseurs gliaux (Glial-Restricted Precursor Cells : GRP), provenant de cerveaux fœtaux de rats, sont resuspendus et transférés délicatement dans le milieu chauffé. Le tube contenant les cellules est centrifugé à 1000 rpm pendant 5 minutes à température ambiante et celles-ci sont resuspendues dans 1 mL de milieu complet (avec FGF-2, un facteur de croissance qui conserve les cellules dans un état indifférencié). Après le comptage en présence de bleu de trypan, les cellules sont ensuiteensemencées dans une flask pré-coatée à une densité de 30 000 à 50 000 cellules/cm². En fin de journée, le milieu est changé. Il le sera ensuite tous les 2 jours. Lorsque les cellules atteignent entre 70% et 90% de confluence, elles sont séparées. Pour ce faire, le milieu est aspiré et la flask est rincée avec du PBS chauffé à 37°C. De la Trypsine/EDTA est ajoutée durant 2-3 minutes. Pour arrêter la réaction, du milieu chauffé à 37°C est ajouté. La flask est ensuite rincée avec du milieu. Après, les cellules sont centrifugées à 1000 rpm et ce, durant 5 minutes. Le surnageant est aspiré et les cellules lavées avec du milieu de culture. Après une nouvelle centrifugation à 1000 rpm durant 5 minutes, les cellules sont séparées etensemencées dans du milieu complet (Tableau 10).

1.3. Différenciation des cellules GRP en astrocytes

Afin de transformer les cellules GRP en astrocytes, le milieu dans lequel baignent les cellules est changé 24 heures après l'ensemencement. Le milieu de différenciation est identique au milieu utilisé précédemment si ce n'est qu'il ne contient pas de FGF-2 et que du BMP4 est ajouté. Ce dernier permet d'induire la différenciation des cellules GRP en astrocytes. Le nouveau milieu est changé tous les 2 jours. Après 7 jours en présence du milieu de différenciation, des astrocytes sont retrouvés.

2. Marquage fluorescent des cellules GRP et des astrocytes

Afin de mettre en évidence la différenciation des cellules GRP en astrocytes, une double immunofluorescence d'A2B5 (GRP) et de la GFAP (astrocytes) est réalisée.

Tout d'abord, les cellules sont rincées avec du PBS et fixées 15 minutes à l'aide de la PFA 4%. La suite du protocole est identique à celui décrit au point 4.3. *Expériences, Double marquage fluorescent* (Tableau 11).

3. Dosage HA (ELISA-like)

Afin de déterminer si les astrocytes sont capables de produire de l'HA *in vitro* avant et après un « scratch », un dosage est réalisé. Le « scratch » consiste en l'induction d'une coupure dans le tapis cellulaire d'astrocytes, dans le but de mimer une lésion mécanique. Le dosage de l'HA est réalisé sur le milieu dans lequel baignent les cellules et a été évalué aux jours 1et 2

	Composition	Firme
Produits		
Glycine 0.1 M	Glycine diluée dans de l'eau distillée	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PBS-0.2% BSA- 0.02% Triton	/	BSA : Amresco, Solon, OH, USA ; Triton : Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hoechst 33258 1/100	Hoechst dilué dans le PBS-0.2%BSA-0.02%	Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA
Mowiol	/	Sigma-Aldrich Corporate Offices, St. Louis, MO, USA
Anticorps primaires		
Anti-GFAP 1/100	Source : souris	Dako North America, Inc., Carpinteria, CA, USA
Anti-A2B5 1/100	Source : lapin	DSHB, Iowa city, IA, USA
Anticorps secondaires		
Anti-souris-Alexa 568 1/1000 (GFAP)	Source : chèvre	Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA
Anti-lapin-Alexa 488 1/1000 (A2B5)	Source : chèvre	Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, OR, USA

Tableau 11 : Matériel nécessaire pour le marquage fluorescent des cellules GRP et des astrocytes.

après le scratch et aux jours 0, 1 et 2 pour les conditions contrôles. Le protocole est identique à celui décrit au point 5.2. *Protocole de dosage*. Les différentes conditions ont été normalisées en calculant la quantité d'ARN retrouvée dans chaque puit. Le protocole d'extraction d'ARN est identique à celui du point 6.2. *Extraction d'ARN*.

RÉSULTATS

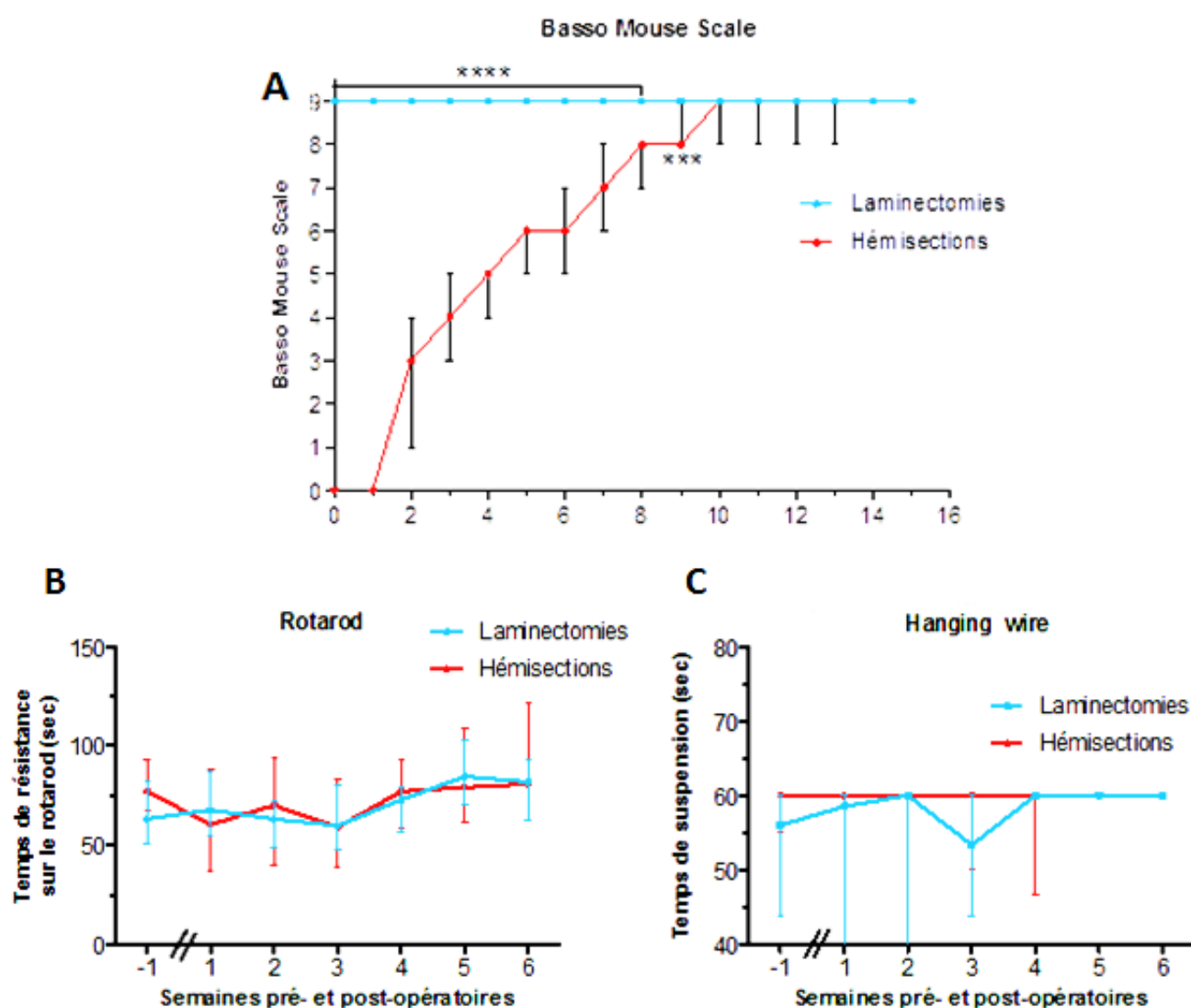


Figure 11 : Évaluation de la récupération motrice des souris laminectomies et hémisections 6 semaines.

La récupération fonctionnelle des souris laminectomies (n=14) et hémisections (n=15) 6 semaines est évaluée en utilisant la BMS et en réalisant des tests comportementaux tels que le Rotarod et le Hanging Wire. **(A)** Au bout de 15 jours après la chirurgie, toutes les souris hémisections obtiennent un score de 9 et ce, jusqu'à la fin de l'expérimentation (de même que les animaux contrôles qui présentent un score de 9 depuis le jour 0). **(B), (C)** Pour le Rotarod et le Hanging Wire, des mesures de base sont réalisées au préalable pour comparer les performances des animaux avant et après la chirurgie. Ces mesures ont été récoltées 1 semaine avant l'opération (-1 sur les graphiques). Les barres d'erreur représentent les médianes $\pm$ interquartiles (** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; **** = $p < 0.0001$)

Résultats

Résultats in vivo

1. Génération d'un modèle murin d'hémisection médullaire

Dans le but de caractériser la distribution spatio-temporelle de l'HA dans la moelle épinière après un trauma ainsi que l'expression des enzymes qui le prennent en charge, une hémisection médullaire droite a été réalisée au niveau thoracique T9 sur des souris mâles C57BL6/J. Quant aux souris contrôles, elles ont uniquement subi une laminectomie.

1.1. Caractérisation fonctionnelle

La récupération motrice des souris sacrifiées 6 semaines après l'hémisection médullaire a été évaluée au cours du temps à l'aide d'une échelle particulière, la BMS ainsi qu'avec des tests comportementaux que sont le Rotarod et le Hanging Wire. Ces 3 méthodes permettent de juger qualitativement et quantitativement la récupération fonctionnelle des animaux. La simple observation des animaux traumatisés met en évidence une paralysie de la patte arrière droite, ipsilatéralement par rapport à l'hémisection médullaire et ce, durant environ 6 jours. Par la suite, la patte paralysée retrouve progressivement sa mobilité. Au début de la récupération, seuls des mouvements de cheville sont observés, mais rapidement, les souris placent la plante de leur patte sur le sol. Après cela, il faut attendre 2 à 3 jours avant d'observer des mouvements totalement coordonnés. Au contraire, les souris contrôles (qui ont subi uniquement une laminectomie) récupèrent complètement leur motricité directement après la chirurgie et l'anesthésie.

○ La BMS

La BMS est une échelle spécialement conçue afin de caractériser la récupération motrice des souris après un trauma médullaire. Elle se base sur l'utilisation de scores (de 0 à 9) afin de déterminer la récupération fonctionnelle des animaux. Celle-ci peut être divisée en 3 phases. Les scores de 0 à 2 sont dédiés à l'évolution du mouvement de la cheville des pattes postérieures. Ensuite, la seconde phase de récupération correspond au placement plantaire des pattes (scores 3-4). Enfin, les scores de 5 à 8 sont consacrés à la position et à la coordination des pattes (antérieures et postérieures) ainsi qu'à la stabilité du tronc. Le score de 9 désigne un animal qui a récupéré totalement de l'opération, c'est-à-dire avec une mobilité normale. (Basso *et al.*, 2006) (Figure 9). L'évaluation du score de chaque souris est réalisée chaque jour et au même moment dans la journée.

Les souris contrôles sont caractérisées par une récupération fonctionnelle totale directement après la chirurgie et l'anesthésie. Elles présentent donc un score de 9 à la BMS. Elles maintiennent ce score maximal jusqu'à la fin de l'expérimentation, c'est-à-dire jusqu'à 6 semaines après la chirurgie (Figure 11 A).

En revanche, les souris hémisections présentent une paralysie complète de la patte postérieure droite, du côté ipsilatéral à la lésion de la moelle épinière. L'hémisection médullaire droite n'ayant pas d'impact sur la motricité de la patte postérieure gauche, il n'est pas nécessaire de

l'évaluer avec la BMS (Toutefois, il pourrait y avoir un effet sur la sensibilité car les voies ascendantes décussent dans la moelle épinière). Par conséquent, l'évaluation de la récupération motrice se focalise uniquement sur la patte postérieure droite. La paralysie totale de cette dernière est observée durant 2 jours chez tous les individus. C'est à partir des deuxième et troisième jours que les animaux commencent à présenter une récupération fonctionnelle. En effet, à ce stade, ils sont capables de réaliser des mouvements de cheville et parfois de placer leur patte sur la plante. De plus, certaines souris démontrent déjà une démarche légèrement coordonnée. La variabilité individuelle à ce stade est assez importante mais elles présentent toutes une récupération très rapide. À partir du septième jour, l'ensemble des souris est caractérisé par un score minimum de 6, ce qui signifie qu'elles ont récupéré la coordination des pattes durant la marche. Pour évaluer la coordination, la patte ipsilatérale et la patte contralatérale à la lésion sont observées ensemble. Jusqu'au neuvième jour après l'opération, les souris hémisections présentent une récupération motrice très réduite par rapport aux animaux ayant subi une laminectomie. C'est seulement au dixième jour que les souris hémisections ne présentent plus de différence significative avec les souris contrôles. Au bout de 15 jours après l'opération et ce, jusqu'à la fin de l'expérimentation (6 semaines), tous les animaux montrent une stabilité normale du tronc et présentent donc un score de 9. En ce qui concerne la patte postérieure contralatérale au côté lésé de la moelle, celle-ci ne démontre aucune paralysie durant toute la durée de l'expérience (Figure 11 A).

○ *Rotarod et Hanging Wire*

Afin d'affiner l'analyse de la récupération motrice et de la fonction musculaire des souris suivies pendant 6 semaines, des tests comportementaux sont réalisés chaque semaine jusqu'au moment du sacrifice. Il est important de préciser que les souris n'accomplissent pas les tests à la semaine 0 (la semaine de la chirurgie) afin de leur laisser du temps pour récupérer de l'opération et de l'anesthésie.

Au niveau du score **Rotarod**, les souris laminectomies et hémisections se maintiennent sur le rotarod durant 60 à 90 secondes. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre ces deux groupes d'animaux étant donné qu'ils suivent une tendance de récupération similaire. De même, aucune différence n'est observée entre les mesures de base récoltées avant l'opération et les tests réalisés après celle-ci. Ces résultats correspondent avec ceux de la BMS. En effet, en analysant les scores de cette échelle, il a été observé que 7 jours après la chirurgie, les souris hémisections récupèrent totalement leur coordination motrice. La première session de Rotarod se déroulant seulement 1 semaine après l'opération, ces résultats concordent donc bien ensemble (Figure 11 B).

Quant au score du **Hanging wire**, les souris laminectomies et hémisections restent suspendues durant 50 à 60 secondes. Tout comme pour le Rotarod, aucune différence n'est observée entre les souris laminectomies et les hémisections. Le temps maximal (fixé arbitrairement à 60 secondes) est atteint dans la majorité des cas, peu importe le moment par rapport à l'opération. Le problème de ce test est que, tout comme le Rotarod, la première session est organisée 1 semaine après l'opération. À ce moment, selon la BMS, toutes les souris hémisections ont déjà récupéré totalement leur motricité. De plus, le Hanging Wire ne permet

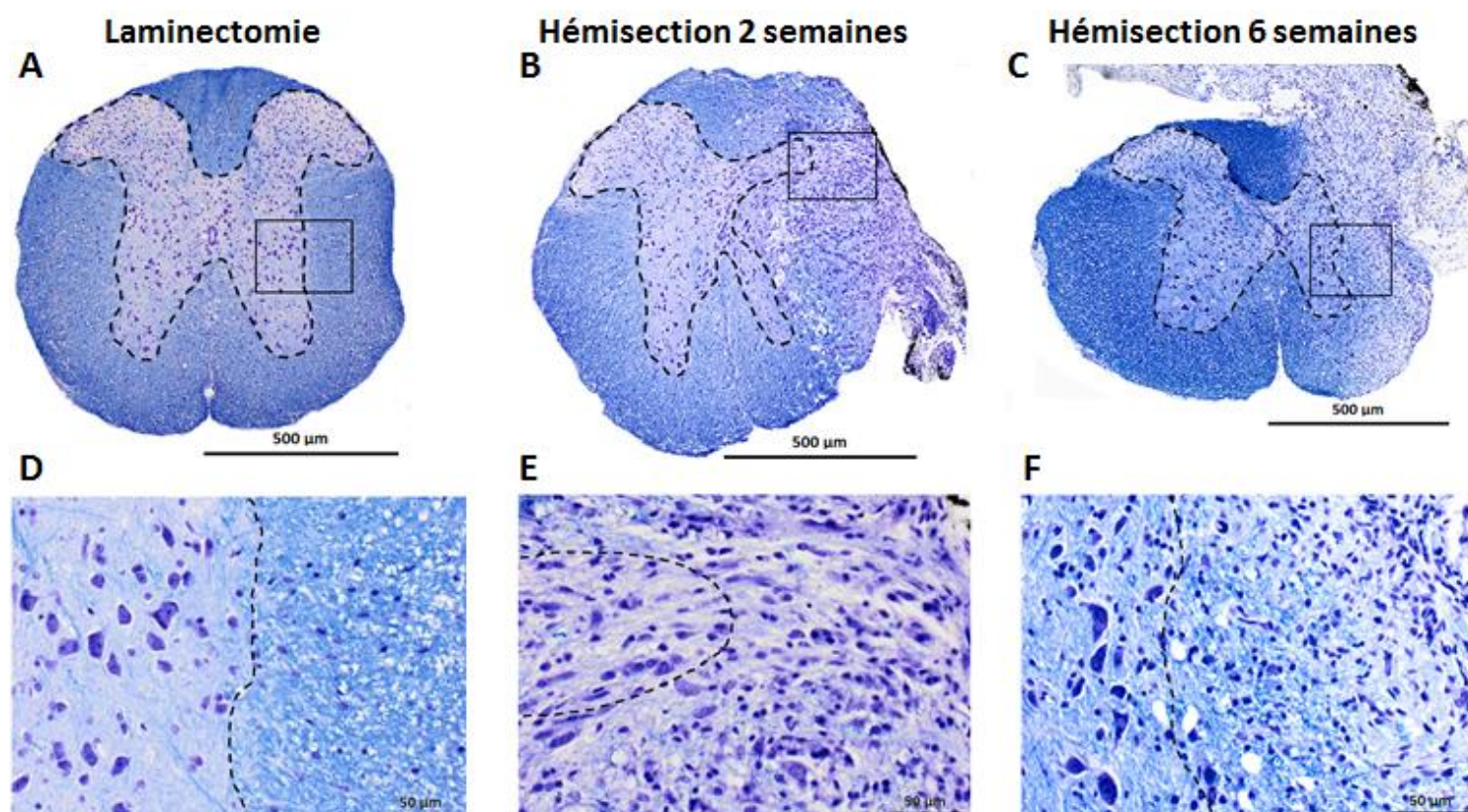


Figure 12: Changements morphologiques observés dans les moelles épinières après une laminectomie ou une hémisection.

Une coloration à l'Ériochrome C et une contre-coloration au Crésyl violet sont réalisées sur des coupes transversales de moelles épinières enrobées en paraffine. L'image (A) montre la structure de la moelle épinière des souris laminectomies. Les images (B) et (C) représentent l'épicentre des lésions des souris hémisections 2 et 6 semaines respectivement. Les images (D), (E) et (F) sont des agrandissements des encadrés de (A), (B) et (C) respectivement. Elles montrent l'interface entre la substance blanche et la substance grise. Les pointillés représentent la limite entre la substance blanche et la substance grise.

pas réellement d'évaluer la fonction musculaire de la patte postérieure ipsilatérale à la lésion, chez les souris hémisection. En effet, lorsque cette patte relâche la grille, les animaux compensent avec les membres antérieurs et la patte postérieure gauche (Figure 11 C).

1.2. Caractérisation morphologique

Dans le but de caractériser des changements morphologiques dans la lésion au niveau thoracique (T9) à 2 et 6 semaines après la chirurgie, une coloration à l'Eriochrome C (pour mettre en évidence la myéline) et une contre-coloration au Crésyl violet (afin de marquer les noyaux des cellules et les corps de Nissl) ont été réalisées. Dans une moelle épinière normale, les noyaux des neurones sont colorés en mauve dans la substance grise alors que la myéline est colorée en bleu. Cette caractérisation morphologique des lésions a également permis d'évaluer la perte neuronale, de quantifier l'étendue, la surface des lésions à différentes distances de l'épicentre et à déterminer leur volume.

○ *Organisation de la moelle épinière*

En ce qui concerne les souris 2 et 6 semaines ayant subi une laminectomie uniquement, la structure des moelles épinières est intacte, avec une parfaite symétrie entre la partie gauche et la partie droite. Les cornes ventrales et dorsales de la substance grise sont bien visibles, avec une délimitation claire entre la substance grise et la substance blanche (Figure 12 A et D). Dans cette dernière, les funiculi antérieurs, postérieurs et latéraux sont également intacts (Figure 12 A). À plus fort grossissement, les noyaux des neurones sont clairement visibles, avec leur nucléole proéminent (Figure 12 D).

Chez les souris hémisections 2 semaines, au niveau de l'épicentre, l'architecture de la moelle épinière est totalement perdue, du côté ipsilatéral à la lésion (Figure 12 B). En effet, la structure générale des cornes ventrales et dorsales est totalement désorganisée et remplie avec du tissu fibreux hypercellularisé. De plus, la majorité des neurones a disparu, remplacée par un infiltrat cellulaire (Figure 12 B et E). Dans la substance blanche, l'hémisection provoque une interruption des fibres localisées au niveau des funiculi antérieurs, postérieurs et latéraux. De nombreuses cellules infiltrent également ces différentes zones (Figure 12 E). La surface lésée maximale est observée dans l'épicentre de la lésion avant de diminuer graduellement de part et d'autre. Dans les régions plus rostrales et plus caudales, la structure normale de la moelle épinière est peu à peu retrouvée et le tissu endommagé est principalement détecté dans la substance blanche, et plus particulièrement dans le funiculus latéral. Étant donné que les souris lésées ont subi une hémisection de la moelle épinière, les changements morphologiques apparaissent uniquement du côté ipsilatéral à la lésion. Le côté contralatéral est épargné, conservant ainsi son architecture normale. Les observations réalisées pour les souris hémisections 6 semaines sont identiques à celles des souris 2 semaines (Figure 12 C et F).

Afin d'avoir une idée de l'ampleur des lésions à 2 et 6 semaines, celles-ci sont quantifiées. Pour ce faire, la surface lésée du côté ipsilatéral est comparée à la surface totale de l'autre moitié de la moelle, qui est contralatérale par rapport à la lésion. Les moelles épinières sont considérées comme étant lésées lorsque des cavités sont apparentes, lorsqu'il y a une infiltration cellulaire et une perte de l'architecture normale (Figure 12 B, C, E et F).

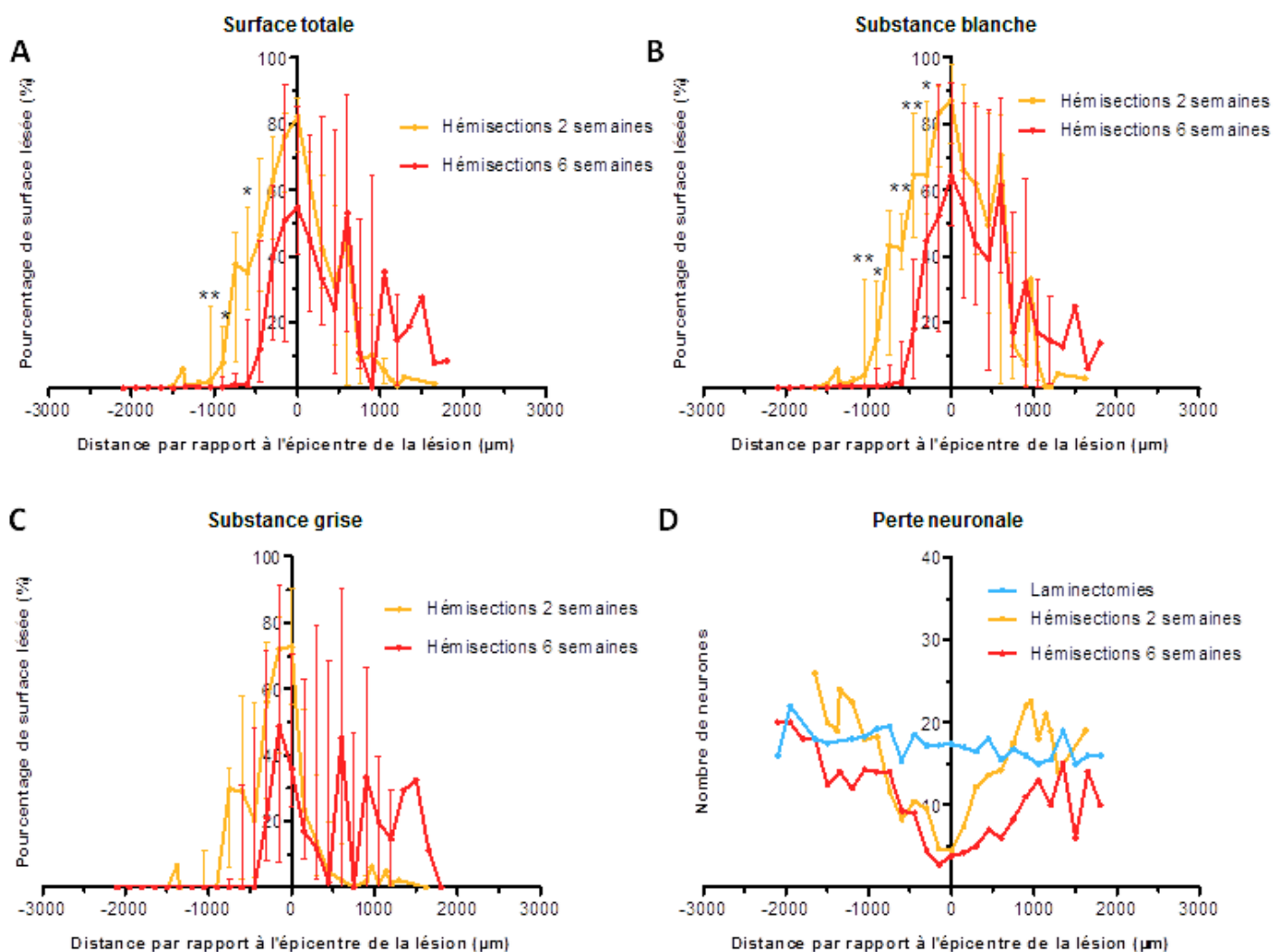


Figure 13 : Quantification des lésions et perte neuronale.

Le pourcentage de surface lésée de la moelle épinière du côté ipsilatéral est évalué par rapport à la surface du côté contralatéral et ce, dans la substance blanche **(B)**, la substance grise **(C)** ou les deux ensemble **(A)**. Cette quantification est réalisée pour les souris hémisections 2 (n=6) et 6 (n=5) semaines. Les barres d'erreur représentent les médianes $\pm$ interquartiles (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$). **(D)** La perte neuronale est également déterminée par comptage des neurones localisés dans la corne ventrale du côté ipsilatéral à la lésion. Le comptage des neurones a également été réalisé dans les laminectomies (n= 5). (Le graphique représente le nombre moyen de neurones en fonction de la distance par rapport à l'épicentre).

L'épicentre de la lésion est défini arbitrairement sur le coupon de moelle épinière caractérisé par le rapport de surface lésée le plus élevé. Le pourcentage de surface lésée diminue ensuite graduellement de part et d'autre de l'épicentre, c'est-à-dire en direction rostrale ainsi qu'en direction caudale. Du côté rostral, une diminution du pourcentage de surface lésée est observée chez les souris 6 semaines par rapport aux souris 2 semaines. Quant au côté caudal, aucune différence n'est mise en évidence entre les deux groupes de souris (Figure 13 A). Ensuite, la substance blanche et la substance grise sont analysées séparément. La substance grise ne présente aucune différence d'un point de vue du pourcentage de surface lésée entre les souris 2 et 6 semaines (Figure 13 C). En revanche, ce pourcentage est réduit de façon significative dans la substance blanche du côté rostral des souris 6 semaines par rapport aux souris 2 semaines (Figure 13 B).

- *Perte neuronale*

La perte neuronale est également évaluée. Pour ce faire, les neurones présents dans la corne ventrale du côté ipsilatéral à la lésion sont comptés chez les souris hémisections 2 et 6 semaines. Ce dénombrement s'est réalisé manuellement, sur les coupes des moelles épinières colorées à l'Eriochrome C et contre-colorées au Crésyl violet. Pour les animaux contrôles, les neurones sont comptés dans la corne ventrale correspondante à celle du côté ipsilatéral à la lésion des souris hémisections.

Chez les souris contrôles, aucune mort neuronale n'est détectée. En effet, les neurones sont présents en grand nombre dans la substance grise, comme démontré précédemment. Ce nombre de neurones reste constant tout le long de la moelle épinière. Le plus souvent, entre 15 et 20 neurones sont observés dans une corne ventrale (Figure 13 D).

En revanche, la perte neuronale est frappante dans l'épicentre de la lésion des souris hémisections. Toutefois, elle est progressive. En effet, dans les zones les plus éloignées de l'épicentre de la lésion, les neurones sont présents en nombre normal, c'est-à-dire une vingtaine. Mais au plus la distance par rapport à l'épicentre diminue, au plus la perte neuronale est importante. Toutefois, cette dernière n'est jamais totale, même lorsque le pourcentage de surface lésée de la moelle épinière est maximal. En effet, à ce niveau, le nombre de neurones tourne aux alentours de 5. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les souris hémisections 2 semaines et 6 semaines. Ces résultats concordent avec ceux obtenus lors de la quantification de la surface lésée par rapport au côté contralatéral, dans la substance grise (Figure 13 D).

- *Longueur et volume des lésions*

Sur base des analyses morphologiques des lésions dans les moelles épinières et en sachant que chaque coupon de moelle épinière coloré est séparé de ses voisins par une distance de 150 μ m, la taille et le volume des lésions ont été évalués.

La **longueur** moyenne des lésions (rostro-caudalement) des souris 2 semaines est de 2.16 mm avec une extension de respectivement 1.135 mm du côté rostral et de 1.020 mm du côté caudal par rapport à l'épicentre. Chez les souris 6 semaines, la longueur moyenne est de 2.34

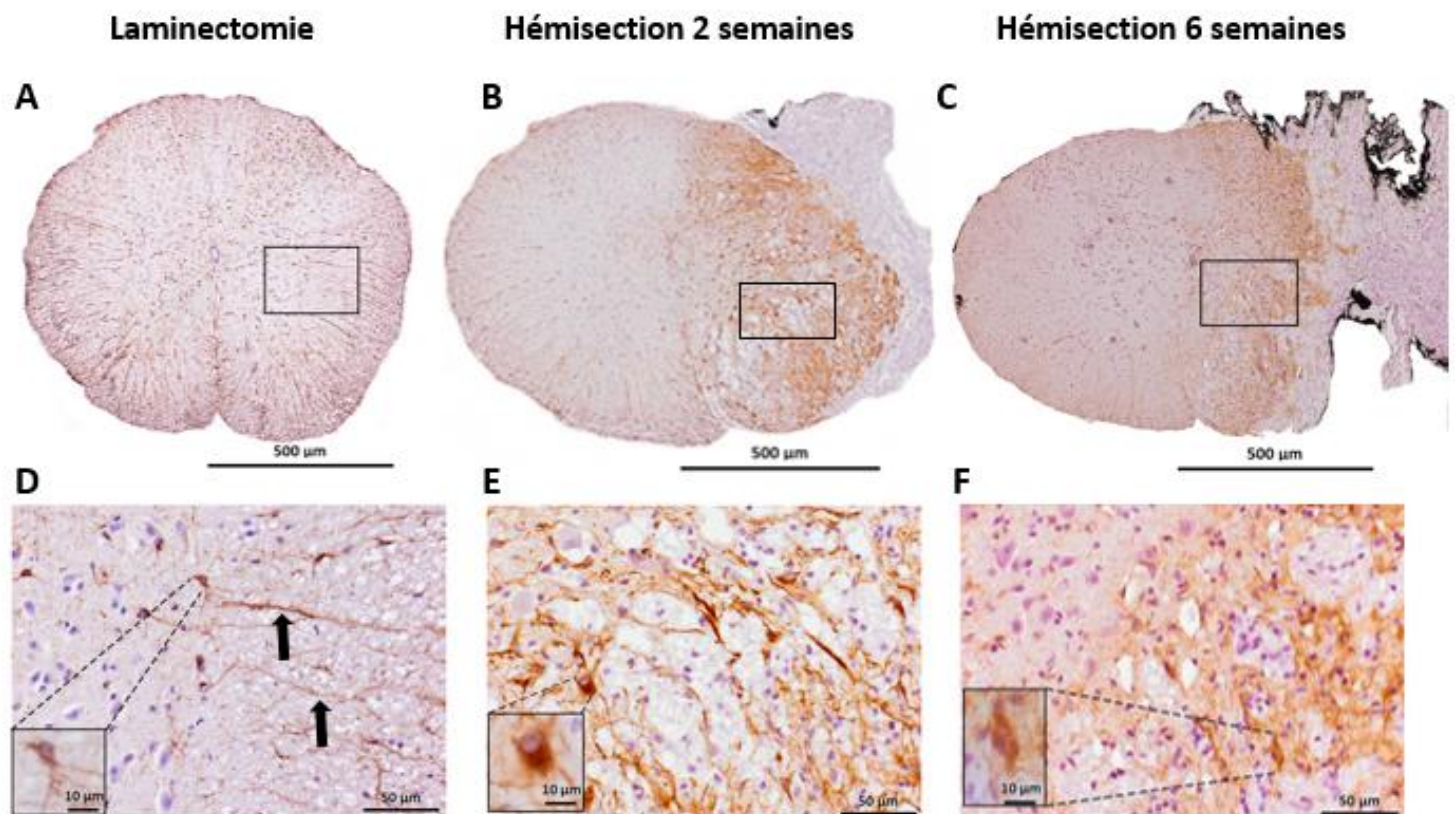


Figure 14 : Répartition et morphologie des astrocytes dans les moelles épinières intactes et lésées.

Un marquage de la GFAP, marqueur spécifique des astrocytes, est réalisé sur des coupes transversales de moelles épinières enrobées en paraffine. L'image (A) montre les astrocytes et leurs prolongements dans la substance blanche (indiqués par les flèches en (D)) chez les souris laminectomies. Les images en (B) et (C) représentent l'épicentre des lésions des souris hémisections 2 et 6 semaines respectivement. Les images en (D), (E) et (F) sont des agrandissements des encadrés de respectivement (A), (B) et (C). Les petits encadrés se trouvant dans les images (D), (E) et (F) sont des agrandissements d'astrocytes.

mm avec une extension de respectivement 1.260 mm du côté rostral et de 1.08 mm du côté caudal par rapport à l'épicentre. Pour la substance grise, la lésion s'étend du côté rostral en moyenne jusqu'à 735 μm chez les souris 2 semaines et jusqu'à 540 μm chez les souris 6 semaines. Les lésions du côté caudal ont une longueur moyenne de 640 μm et de 600 μm pour les souris 2 et 6 semaines respectivement. En ce qui concerne la substance blanche, la lésion s'étend en moyenne jusqu'à 1.135 mm du côté rostral chez les animaux 2 semaines et jusqu'à 1.260 mm chez les souris 6 semaines. Enfin, le côté caudal est étendu jusqu'à environ 1.020 mm chez les 2 semaines et 1.080 mm chez les 6 semaines. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les souris 2 et 6 semaines (à la fois dans la substance blanche et la substance grise).

Le **volume** moyen des lésions a également été calculé en utilisant la formule décrite dans le point 4.3 de la section *Matériel et méthodes*. Le volume moyen des lésions des souris 2 semaines est de 0.392 mm³ et celui des souris 6 semaines est de 0.256 mm³. Il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes en raison d'une variabilité trop importante entre les individus du groupe de souris hémisections 6 semaines (données non-montrées).

2. Mise en évidence de la cicatrice gliale

Lorsqu'un trauma médullaire est induit, il provoque une série d'évènements biologiques en cascade. L'un des phénomènes les plus importants est la formation de la cicatrice gliale. Celle-ci consiste principalement en l'activation et la prolifération d'astrocytes, mais aussi en l'invasion de cellules immunitaires (macrophages dérivés du sang et activation de la microglie résidente du système nerveux central), formant une barrière « gliale » isolant le tissu lésé du tissu nerveux sain.

2.1. Implication des astrocytes

Afin de déterminer si une cicatrice gliale s'est développée suite à l'activation des astrocytes, en réponse à l'hémisection médullaire, un marquage de la GFAP a été réalisé. La GFAP est une protéine fibrillaire acide de la famille des filaments intermédiaires et qui est exprimée par les astrocytes. Elle constitue donc un marqueur de ces derniers. Lorsque les astrocytes sont activés, l'expression de cette protéine augmente fortement (Poumay, 2015).

Chez les souris laminectomies 2 et 6 semaines, le marquage de la GFAP est caractérisé par un même profil. Dans les deux cas, la GFAP est peu marquée et se trouve principalement dans la substance blanche, signe de la présence des astrocytes fibreux (Figure 14 A). En effet, leurs longs et fins prolongements sont visibles dans cette partie de la moelle épinière (Figure 14 D). Quelques astrocytes protoplasmiques sont également dispersés de façon homogène dans la substance grise (Encadré, figure 14 D).

Chez les souris hémisections 2 semaines, au niveau de l'épicentre et du côté ipsilatéral à la lésion, le marquage de la GFAP est fortement augmenté, signe de la prolifération de nombreux astrocytes (Figure 14 B). De plus, des astrocytes hypertrophiés sont également observés, ce qui souligne leur activation en réponse au trauma médullaire (Encadré, figure 14 E). Il est important de noter que seul le côté ipsilatéral à la lésion est concerné par cette

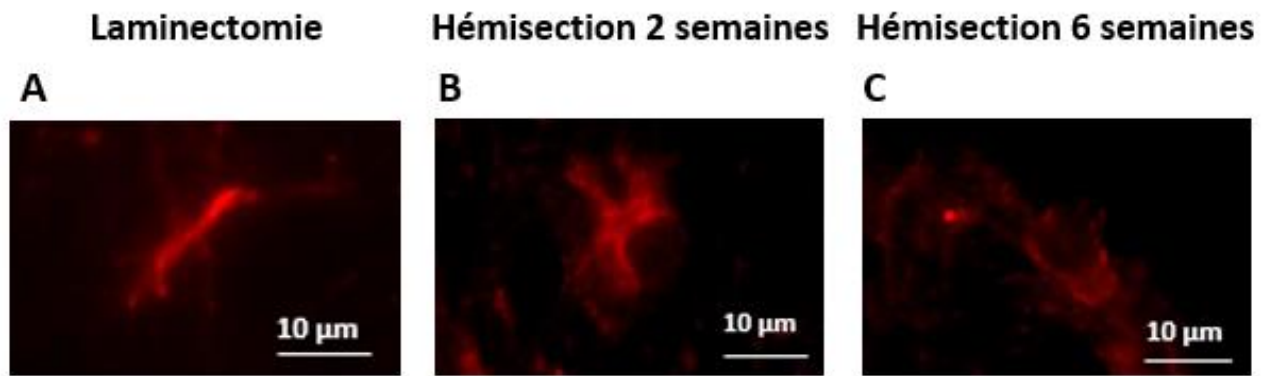


Figure 15 : Morphologie des astrocytes dans les moelles épinières intactes et lésées.

Un marquage fluorescent permet de mettre en évidence la GFAP (en rouge) sur des coupes transversales de moelles épinières enrobées en paraffine. L'image (A) montre un astrocyte protoplasmique chez les souris laminectomies. Les images en (B) et (C) représentent des astrocytes présents dans l'épicentre des lésions des souris hémisections 2 et 6 semaines respectivement. Elles sont prises du côté ipsilatéral, à proximité de la lésion.

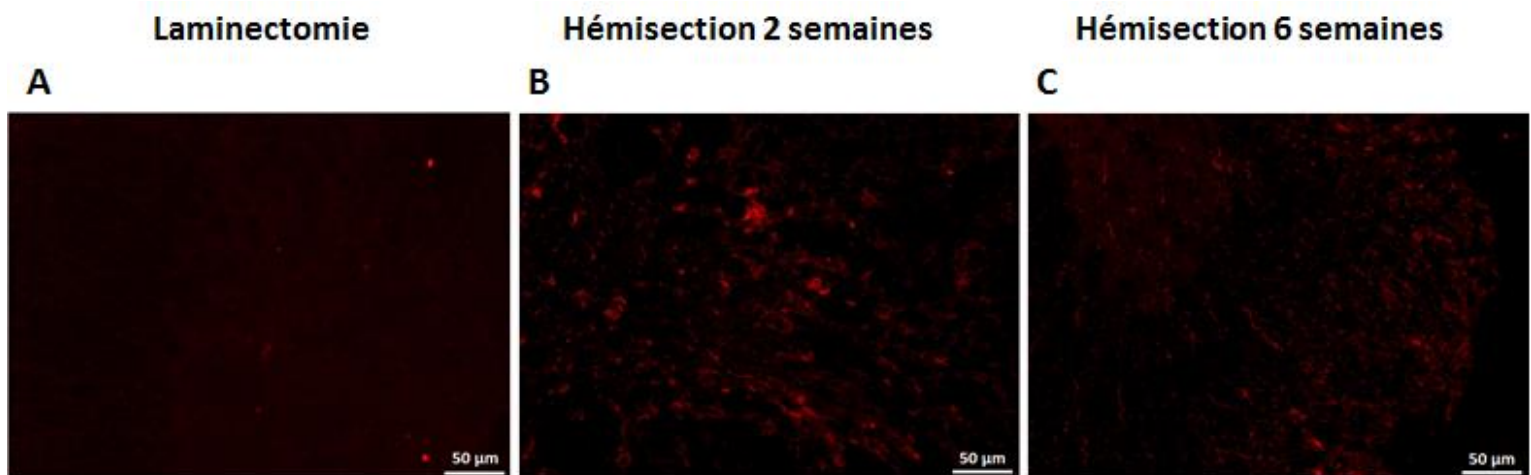


Figure 16 : Activation de la microglie après un trauma médullaire.

Un marquage fluorescent permet de mettre en évidence Iba1, un marqueur spécifique de la microglie activée, sur des coupes transversales de moelles épinières enrobées en paraffine. (A) Chez les souris laminectomies, Iba1 n'est pas mis en évidence. Les images en (B) et (C) représentent l'épicentre des lésions des souris hémisections 2 et 6 semaines respectivement. Elles sont prises du côté ipsilatéral à la lésion.

augmentation du marquage de la GFAP. En effet, le côté contralatéral est caractérisé par une distribution des astrocytes identique aux souris contrôles.

Chez les souris hémisections 6 semaines, la GFAP est marquée de la même manière que chez les souris hémisections 2 semaines, du côté ipsilatéral à la lésion (Figure 14 C). Toutefois, à plus fort grossissement, le marquage semble plus diffus que chez les animaux 2 semaines. Même s'ils sont toujours bien présents, les astrocytes hypertrophiés sont plus difficiles à repérer et semblent moins nombreux. De plus le marquage de la GFAP dans leur cytoplasme apparaît atténué (Encadré, figure 14 F). Par conséquent, cela suggère que les astrocytes ne sont plus dans un état aussi activé que 2 semaines après le trauma médullaire. Le côté contralatéral ne présente pas de différence avec ce qui est observé chez les animaux contrôles.

Une immunofluorescence a également été réalisée afin de mettre en évidence la GFAP et d'observer la morphologie des astrocytes. Les images obtenues confirment les observations précédentes concernant la distribution et la morphologie de ces cellules.

Chez les souris contrôles, des astrocytes protoplasmiques sont clairement observés dans la substance grise, accompagnés de leurs prolongements irréguliers caractéristiques (Figure 15 A). Les fins prolongements des astrocytes fibreux sont également visibles.

Chez les souris hémisections 2 semaines, des astrocytes hypertrophiés activés sont mis en évidence du côté lésé de la moelle épinière (Figure 15 B). Ceux-ci ne sont pas présents du côté contralatéral de la lésion. Chez les souris hémisections 6 semaines, le marquage fluorescent de la GFAP est également diffus, tout comme le marquage au diaminobenzidine l'avait démontré. Des astrocytes hypertrophiés sont également retrouvés chez les souris 6 semaines, bien qu'en nombre réduit. De plus, la GFAP semble moins marquée dans ces derniers, en comparaison avec les astrocytes retrouvés chez les souris hémisections 2 semaines (Figure 15 C). Ces constatations confirment les observations réalisées sur les coupes de moelles épinières marquées à l'aide d'une peroxydase. Dans le côté contralatéral des moelles lésées, des astrocytes protoplasmiques sont mis en évidence.

2.2. Présence de microglie au sein de la cicatrice gliale

Afin de confirmer la présence de microglie au sein de la cicatrice gliale, une immunofluorescence anti-Iba1 a été réalisée. Iba1 ou Ionized calcium binding adaptor molecule 1 est une protéine de liaison au calcium qui est surexprimée dans la microglie activée (Ito *et al.*, 1998).

Dans les moelles épinières issues des souris ayant subi une laminectomie, Iba1 n'est pas du tout mise en évidence, ce qui signifie que la microglie se trouve à un état quiescent (Figure 16 A).

Chez les souris hémisections 2 semaines, Iba1 est exprimée et est localisée à proximité de la zone lésée, du côté ipsilatéral à la lésion. Cela signifie donc que la microglie est activée à cet endroit (Figure 16B). En revanche, Iba1 n'est pas retrouvée du côté contralatéral à la lésion.

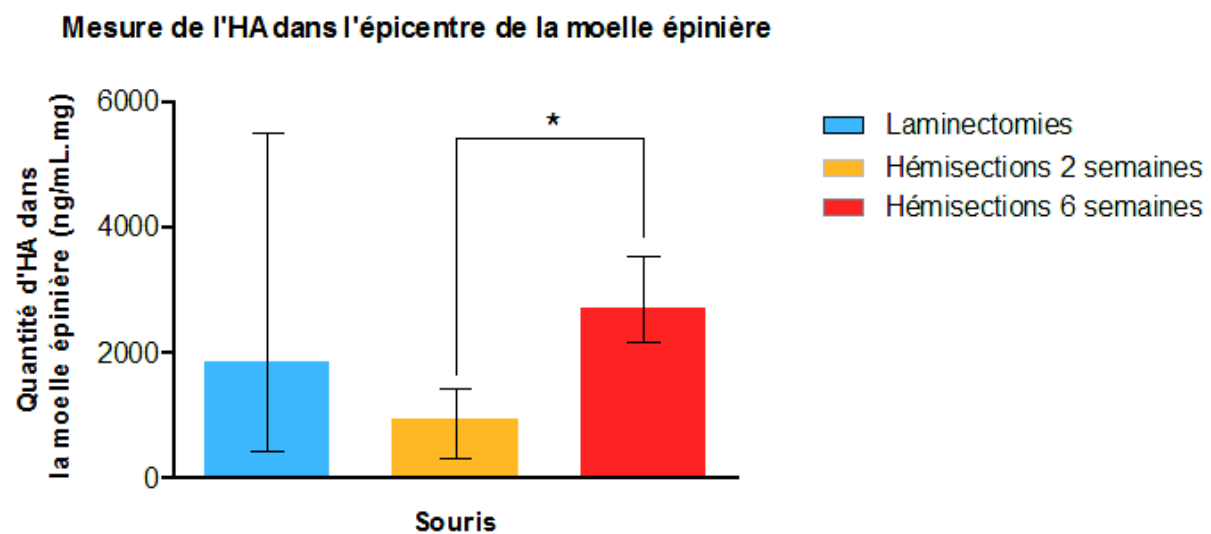


Figure 17 : Mesure de la quantité d'HA dans l'épicentre des moelles épinières intactes et lésées.

Un dosage de l'HA a été réalisé dans les moelles épinières intactes et lésées. Les laminectomies 2 semaines (n=5), les hémisections 2 (n=8) et 6 (n=5) semaines ont été comparées. Les barres d'erreur représentent les médianes $\pm$ interquartiles (* = $p < 0.05$).

Par contre, chez les souris hémisections 6 semaines, le marquage d'Iba1 est quelque peu diminué et plus diffus à proximité du site de la lésion, en comparaison avec celui des souris hémisections 2 semaines (Figure 16 C). Le côté contralatéral est également dépourvu de tout marquage, tout comme les animaux contrôles.

3. Quantification de l'HA dans des moelles épinières intactes et lésées

Après avoir mis en évidence la présence d'une cicatrice gliale formée suite à l'activation et la prolifération des astrocytes, une quantification de l'HA a été réalisée dans l'épicentre des lésions.

La quantité d'HA présent chez les souris contrôles 2 semaines a été comparée à la quantité d'HA présent à la fois chez les souris hémisections 2 et 6 semaines. Aucune différence statistiquement significative de la concentration n'est observée, en raison de la variabilité importante du groupe contrôle. En revanche, lorsque les deux groupes de souris blessées sont comparés entre eux, une augmentation statistiquement significative de la quantité d'HA est observée chez les hémisections 6 semaines par rapport aux hémisections 2 semaines. Au niveau de l'épicentre des lésions, les individus 6 semaines contiennent en moyenne 2811.33 ng/mL.mg d'HA tandis que les individus 2 semaines en contiennent seulement 1676.98 ng/mL.mg de moyenne (Figure 17).

4. Mise en évidence de l'HA dans la moelle épinière

4.1. Étude de la distribution intramédullaire de l'HA

Dans les moelles épinières intactes (souris laminectomies 2 et 6 semaines), l'HA est observé à la fois dans la substance blanche et la substance grise (Figure 18 A). Dans cette dernière, il est principalement perçu autour des corps cellulaires des neurones pour former les filets périneuronaux (Encadré, figure 18 D). Dans la substance blanche, l'HA est visible le long de stries radiaires. Celles-ci marqueraient la continuité du filet périneural le long des dendrites proximales (Figure 18 D).

En revanche, au niveau de l'épicentre des lésions des souris hémisections 2 et 6 semaines, l'HA est davantage marqué du côté ipsilatéral à la lésion, par rapport au côté non-lésé (Figure 18 B et C). De plus, le marquage semble légèrement plus fort dans la substance blanche, à l'endroit où l'architecture du tissu est désorganisée. Plus particulièrement, les cellules infiltrantes, participant à la formation de la cicatrice gliale, sont entourées par des dépôts d'HA (Figure 18 E et F). Dans la substance grise, le filet périneuronal n'est plus visible sur les corps cellulaires des neurones restants (Encadré, figure 18 E et F). Au contraire, dans le côté contralatéral, la distribution de l'HA est identique à celle observée chez les souris contrôles. Les corps neuronaux conservent leur filet périneuronal et ce dernier persiste toujours le long des dendrites proximales.

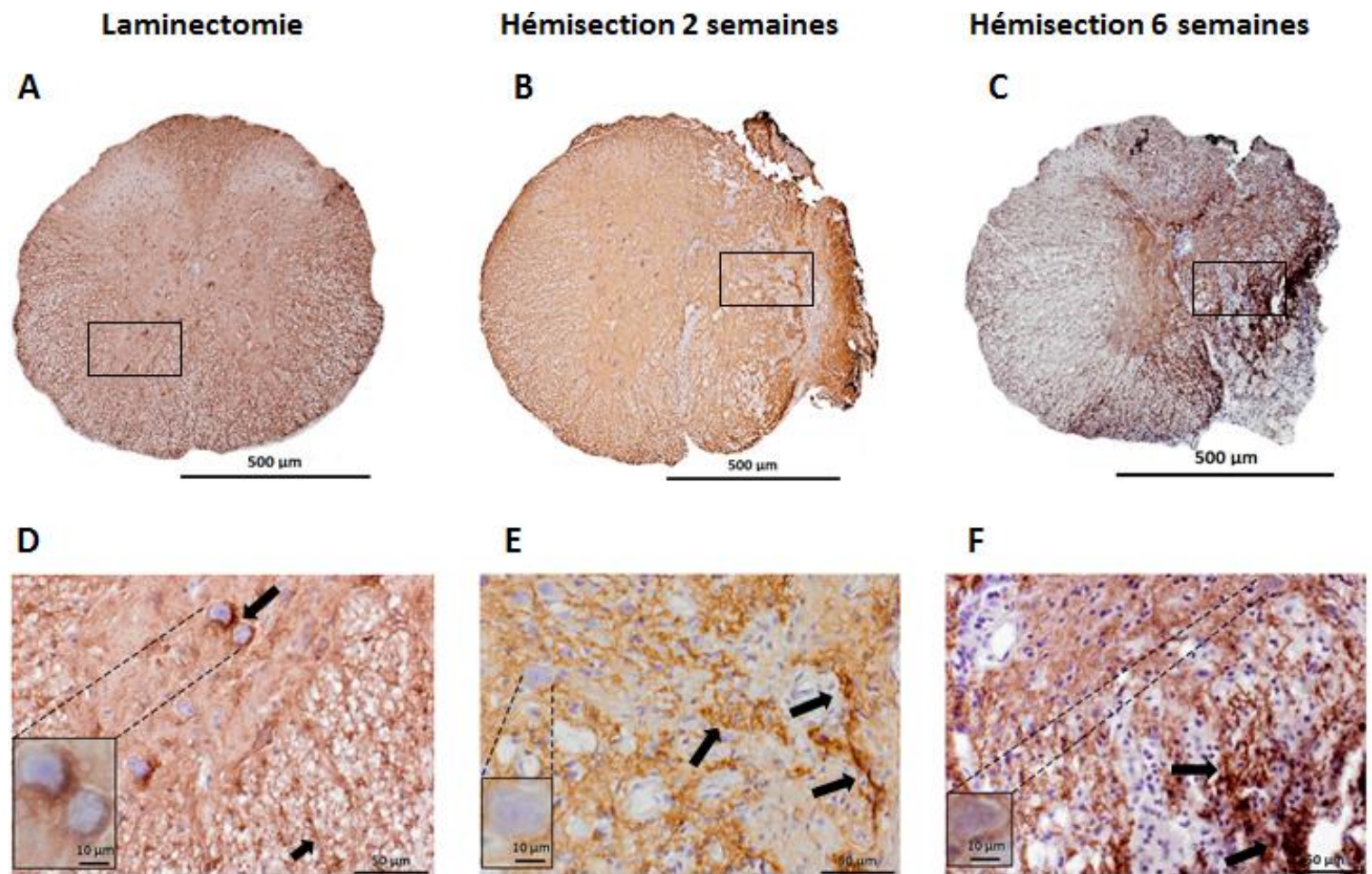


Figure 18 : Distribution de l'HA dans les moelles épinières intactes et lésées.

Un marquage de l'HA, est réalisé sur des coupes transversales de moelles épinières enrobées en paraffine. L'image (A) montre la répartition de l'HA chez les souris laminectomies. Les images en (B) et (C) représentent l'épicentre des lésions des souris hémisections 2 et 6 semaines respectivement. Les images en (D), (E) et (F) sont des agrandissements des encadrés de (A), (B) et (C) respectivement. Les petits encadrés se trouvant dans les images (D), (E) et (F) sont des agrandissements des corps cellulaires des neurones. (D) La grande flèche montre un filet périneuronal et la petite flèche montre une strie d'HA dans la substance blanche. (E), (F) Les dépôts d'HA autour des cellules infiltrantes sont pointés par les flèches.

4.2. Étude de la co-localisation de l'HA avec les astrocytes

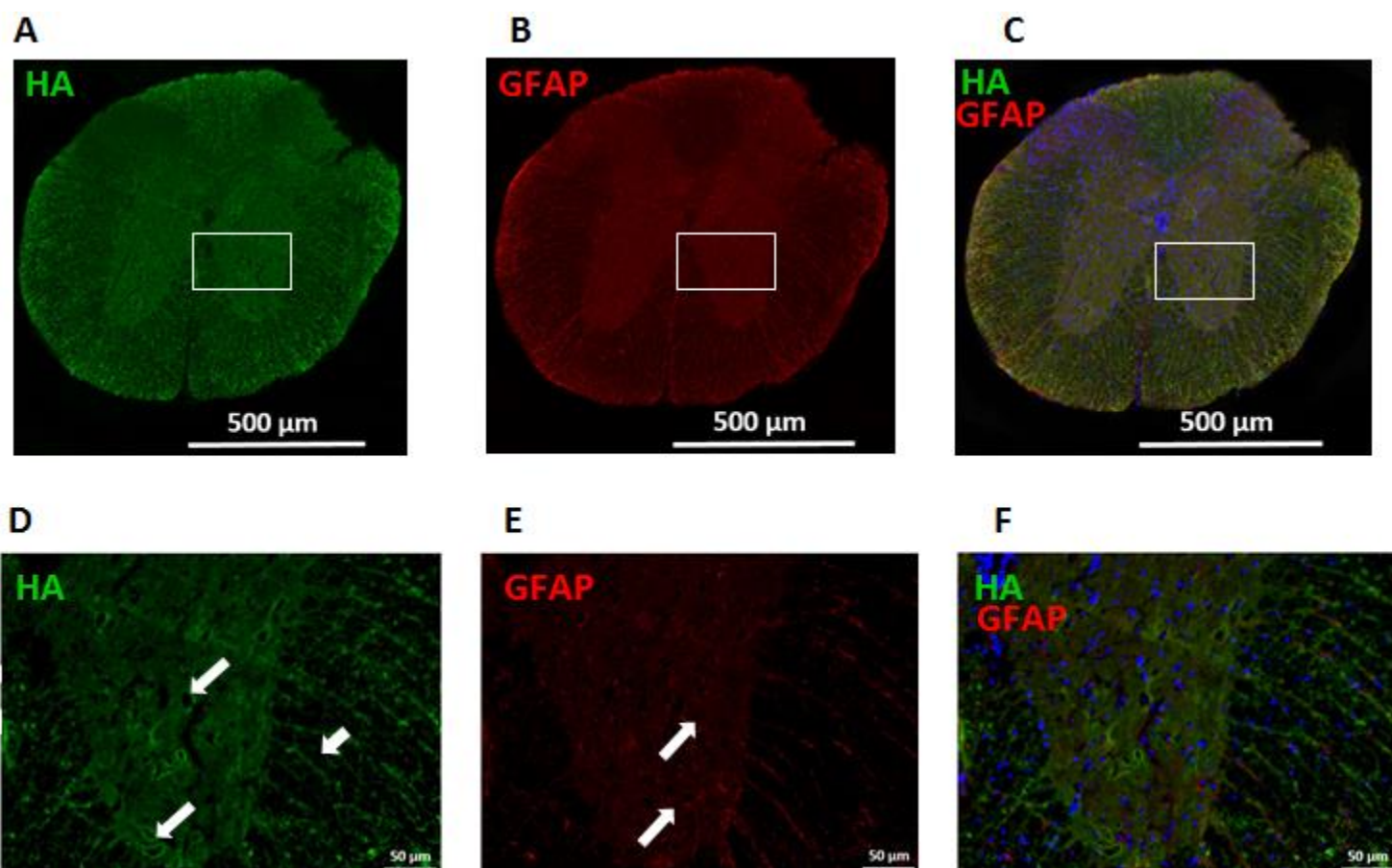
Afin d'évaluer l'éventuelle implication des astrocytes dans le métabolisme de l'HA après un trauma médullaire, une double immunofluorescence a été réalisée dans le but de mettre en évidence l'HA et la GFAP.

Chez les souris laminectomies (2 et 6 semaines), l'HA est visible dans l'ensemble de la moelle épinière de façon relativement homogène, sauf au niveau des filets périneuronaux dans lesquels l'HA est plus concentré. Dans la substance blanche, l'HA est plus concentré le long des dendrites proximales en raison de la continuité des filets périneuronaux (Figure 19 A, D). En ce qui concerne la GFAP, à faible grossissement, le marquage est principalement observé dans la substance blanche. Des stries radiaires sont visibles dans cette zone (Figure 19 B). À plus fort grossissement, le marquage montre quelques astrocytes protoplasmiques localisés dans la substance grise, ainsi que les longs et fins prolongements des astrocytes fibreux dans la substance blanche, qui forment les stries radiaires (Figure 19 E). Ces cellules montrent une distribution homogène dans l'entièreté de la moelle épinière. Aucune co-localisation de l'HA avec la GFAP n'est mise en évidence dans ces moelles épinières intactes (Figure 19 C et F).

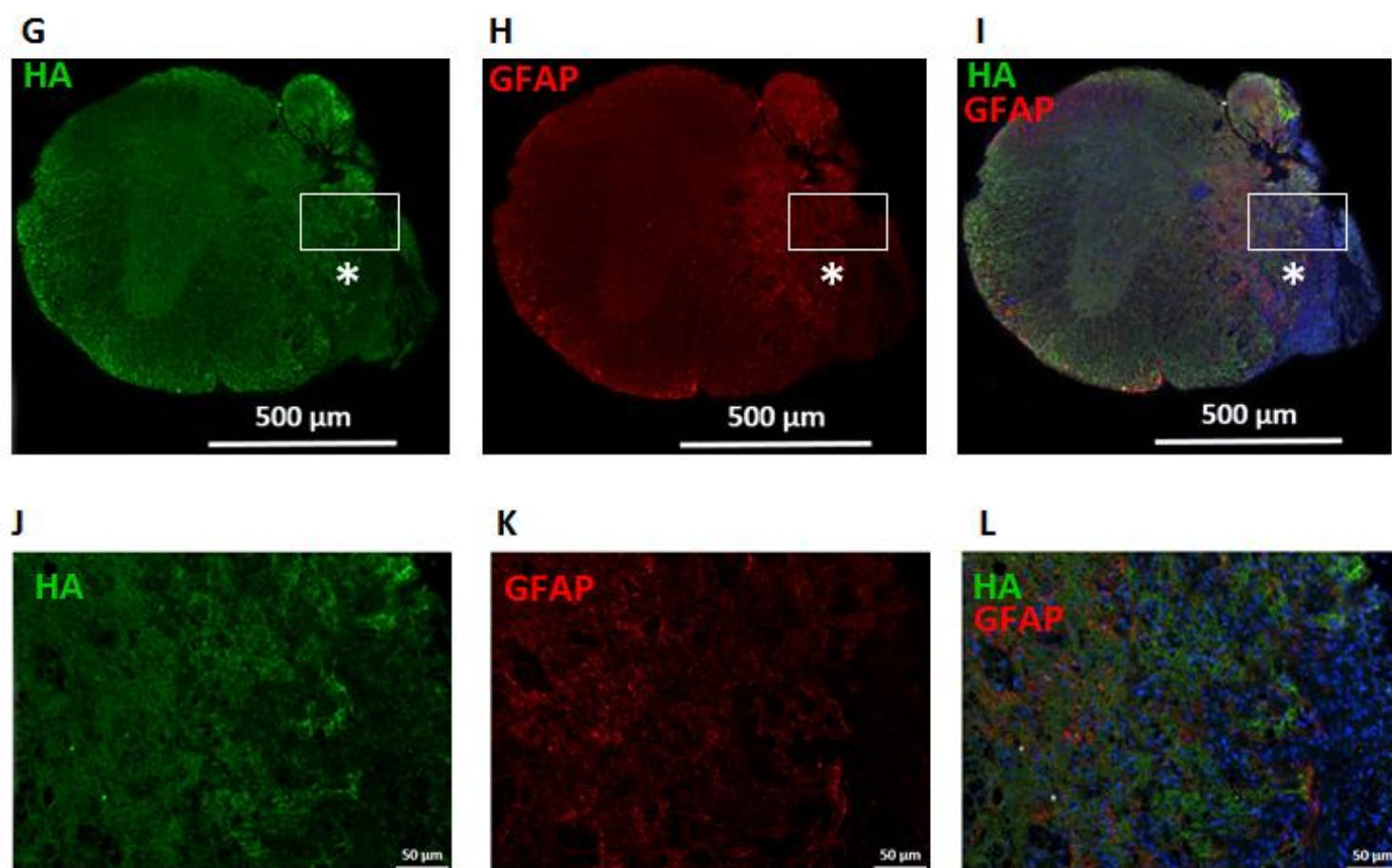
Chez les souris hémisections 2 semaines, du côté contralatéral de la lésion, l'HA est présent de façon homogène, de la même manière que chez les individus contrôles. En revanche, du côté ipsilatéral de la lésion, l'HA a perdu sa distribution normale dans la moelle épinière. En effet, la zone de la lésion en est complètement dépourvue. Par contre, il semble s'accumuler autour de la lésion pour former une coque d'HA (Figure 19 G et J). Lorsque la moelle épinière est observée à faible grossissement, du côté contralatéral à la lésion, la GFAP présente un marquage identique à ce qui est observé chez les souris laminectomies. En effet, des astrocytes protoplasmiques sont distribués de façon homogène dans la substance grise, de même que les prolongements des astrocytes fibreux dans la substance blanche. En revanche, un marquage plus fort est observé au niveau de la lésion par rapport au côté contralatéral. (Figure 19 H). Au niveau de l'épicentre, des astrocytes hypertrophiés actifs sont visibles à proximité de la lésion, et plus particulièrement autour de la coque formée par l'HA. La morphologie de ces astrocytes est visible sur la Figure 15 B. Au niveau de cette coque, le marquage de la GFAP est beaucoup plus diffus et peu de corps cellulaires astrocytaires sont visibles (Figure 19 K). Grâce au marquage des noyaux par le Hoechst, une augmentation de la cellularité est observée principalement dans la zone de lésion dépourvue d'HA. Le marquage de la GFAP est également absent de cette zone (Figure 19 I). Par conséquent, cela signifie que les cellules qui envahissent la lésion ne sont pas des astrocytes. De plus, aucune co-localisation n'est observée entre l'HA et la GFAP (Figure 19 L).

Chez les souris hémisections 6 semaines, la distribution de l'HA du côté contralatéral à la lésion reste inchangée par rapport aux observations précédentes (Figure 19 M). De plus, du côté ipsilatéral à la lésion, la même zone dépourvue d'HA est observée dans la lésion (Figure 19 M et P). Toujours du côté ipsilatéral, le marquage de la GFAP est augmenté par rapport au reste de la moelle épinière (Figure 19 N). Les astrocytes sont majoritairement localisés en bordure de la coque d'HA, tout comme chez les souris hémisections 2 semaines. La morphologie hypertrophique de ces astrocytes est visible sur la figure 15 C, de même qu'une

Laminectomies



Hémisections 2 semaines



diminution de l'intensité du marquage de la GFAP dans ces cellules. Le marquage plus diffus de la GFAP est également conservé (Figure 19 Q). Lorsque les images du marquage de l'HA et celui de la GFAP sont superposées, une co-localisation partielle est observée dans la coque d'HA (Figure 19 O et R).

5. Étude de l'expression des ARNm des hyaluronan synthases et des hyaluronidases

Afin de déterminer de quelle manière est régulé le métabolisme de l'HA après l'induction d'une lésion de la moelle épinière, le profil d'expression des ARNm de *HAS1*, *HAS2*, *HAS3*, *HYAL1* et *HYAL2* a été étudié. L'ARN est tout d'abord extrait des moelles épinières avant d'être transformé en ADNc (ADN complémentaire) par reverse transcription. Ensuite, une PCR quantitative en temps réel est réalisée sur ces ADNc afin de déterminer l'expression relative des ARNm des enzymes prenant en charge l'HA.

En ce qui concerne les **hyaluronidases**, seules *HYAL1* et *HYAL2* ont été étudiées. En effet, les autres gènes ne possèdent pas d'activité hyaluronidase ou bien les enzymes sont localisées dans des tissus bien particuliers. Ils ne représentent donc pas un grand intérêt dans cette étude. En revanche, Hyal-1 et Hyal-2 agissent de concert pour dégrader l'HA présent dans la MEC. Étudier l'expression relative de leurs ARNm pourrait donc permettre d'éclaircir le mécanisme de régulation du métabolisme de l'HA après un trauma médullaire.

Tout d'abord, chez les souris hémisections 2 et 6 semaines, *HYAL1* ne montre pas de différence statistiquement significative avec les animaux contrôles correspondants (Figure 20 A). Ensuite, pour *HYAL2*, des différences statistiquement significatives sont observées entre les souris hémisections 2 et 6 semaines et les souris laminectomies correspondantes. Dans les deux cas, les souris hémisections présentent une augmentation de l'expression d'*HYAL2* par rapport aux animaux contrôles, ce qui suggère une dégradation augmentée de l'HA après un trauma médullaire (Figure 20 B).

Pour l'étude de l'expression de l'ARNm des **hyaluronan synthases**, seules *HAS1* et *HAS3* ont pu être mises en évidence, des problèmes techniques ayant été rencontrés avec les primers de *HAS2*. Par conséquent, nous ne pouvons pas éliminer la possibilité d'expression de cette enzyme dans la moelle épinière.

En ce qui concerne *HAS1*, pour les animaux 2 semaines, les souris hémisections présentent une expression relative en ARNm significativement réduite par rapport à celle des souris laminectomies. Cette tendance n'est pas observée chez les animaux 6 semaines (Figure 20 C). Par contre, *HAS3* est exprimée plus fortement chez les souris hémisections 6 semaines par rapport aux souris contrôles correspondantes. Il n'y a pas de différence significative entre les laminectomies et les hémisections 2 semaines (Figure 20 D).

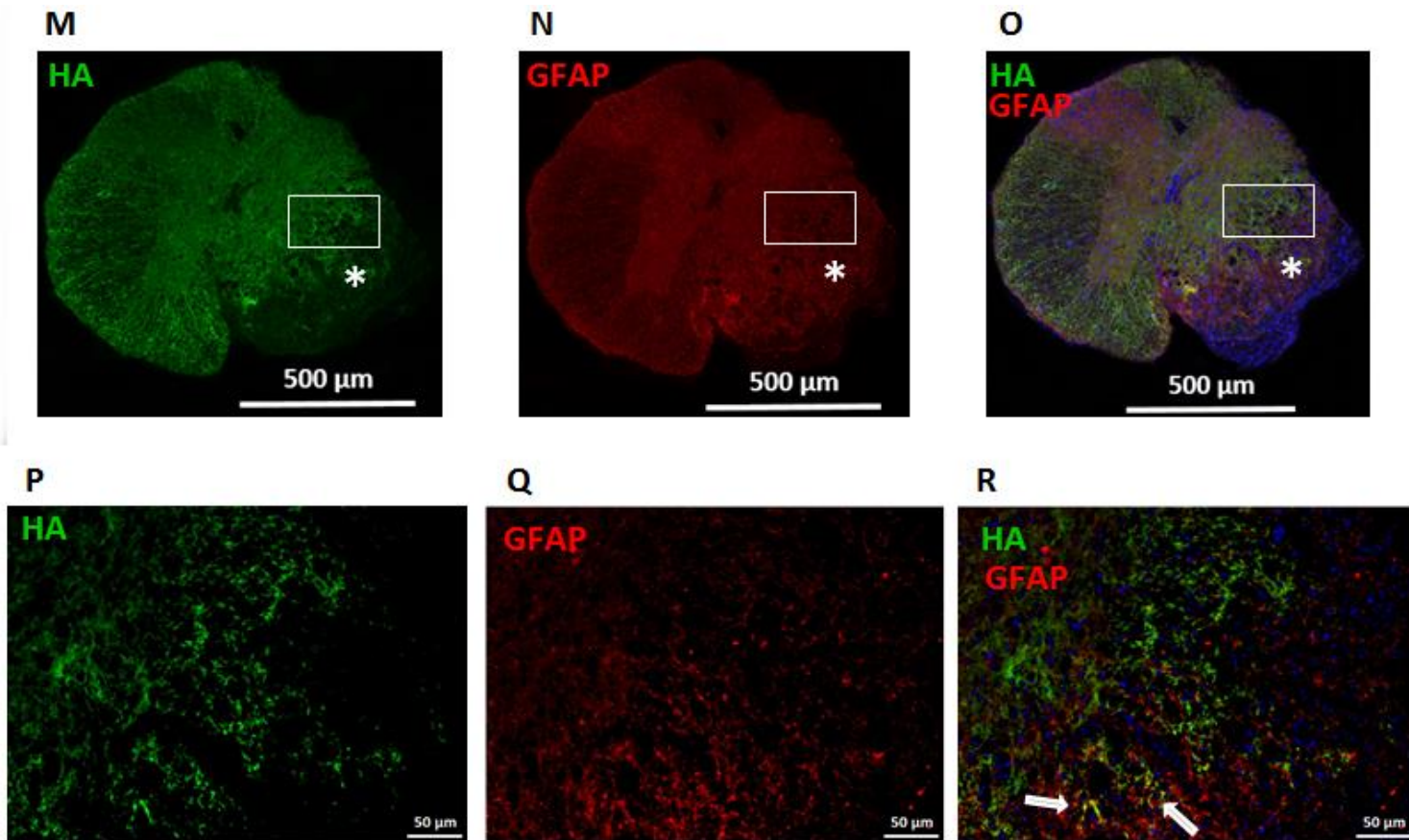


Figure 19 : Mise en évidence de l'HA et de la GFAP dans les moelles épinières après une laminectomie ou une hémisection.

Une double immunofluorescence permet de mettre en évidence l'HA en vert et la GFAP en rouge sur des coupes transversales de moelles épinières enrobées en paraffine. Les noyaux sont marqués en bleu, par le Hoechst. Les images (A), (B), (C), (G), (H), (I), (M), (N) et (O) montrent le marquage de l'HA et de la GFAP dans des moelles épinières entières. Les images (D), (E), (F), (J), (K), (L), (P), (Q) et (R) sont les agrandissements des images correspondantes à faible grossissement. Les images (C), (F), (I), (L), (O) et (R) représentent la superposition des images de l'HA et de la GFAP pour chaque condition. (A) Les grandes flèches blanches montrent les filets périneuronaux et la petite flèche indique une strie d'HA dans la substance blanche. (B) Les astrocytes protoplasmiques sont indiqués par les flèches blanches. (I) La co-localisation entre la GFAP et l'HA est visible en jaune et est indiquée par les flèches blanches. Les astérisques blancs se trouvant sur les images (G), (H), (I), (M), (N) et (O) indiquent la zone de la lésion.

Résultats *in vitro*

Afin de découvrir les cellules qui sont capables de produire de l'HA lors de l'induction d'une lésion de la moelle épinière, une étude *in vitro* a été réalisée. Dans ce projet, ce sont plus particulièrement les astrocytes qui ont été étudiés.

1. La différenciation des cellules GRP en astrocytes

Afin de s'assurer que les cellules GRP se sont correctement transformées en astrocytes, une double immunofluorescence a été réalisée avec un anticorps anti-A2B5 (cet anticorps reconnaît spécifiquement un antigène se trouvant à la surface des cellules GRP) et un anticorps anti-GFAP.

Lorsque le FGF-2 (un facteur qui inhibe la différenciation des cellules précurseurs) est présent dans le milieu, les cellules sont fortement positives pour A2B5. En revanche, la GFAP n'est pas mise en évidence (Figure 21 A). Par conséquent, cela signifie que les cellules retrouvées sont uniquement des GRP et que la différenciation est correctement inhibée.

Afin d'induire la différenciation cellulaire, le FGF-2 est éliminé du milieu de culture. Du BMP4, un facteur qui induit la différenciation des GRP en astrocytes, est alors ajouté. 7 jours après l'ajout de ce facteur de différenciation, une double immunofluorescence est à nouveau réalisée. Un marquage plus intense de la GFAP est observé, tandis que le nombre de cellules positives pour A2B5 est fortement réduit (Figure 21 B). Par conséquent, cela signifie que les GRP se sont correctement différenciées en astrocytes, bien que quelques cellules positives pour A2B5 soient toujours présentes dans un état indifférencié. De plus, les astrocytes générés semblent posséder un phénotype d'astrocytes protoplasmiques.

2. Quantification de l'HA

Dans le but de déterminer si les astrocytes sont capables de produire de l'HA *in vitro* dans des conditions « normales » ou dans des conditions mimant une hémisection médullaire, un nouveau dosage de l'HA a été réalisé.

En raison d'un manque de temps, cette expérience n'a pu être réalisée dans de bonnes conditions, étant donné que certaines mises au point restent encore à faire. Toutefois, il semblerait que les astrocytes dans les conditions contrôles soient capables de produire de l'HA, bien qu'en quantité très faible. Après l'induction d'un scratch, les cellules semblent également capables d'en synthétiser, mais aucune différence n'a pu être mise en évidence avec les cellules contrôles (données non-montrées). Néanmoins, il est important de noter que le dosage de l'HA se réalise sur le milieu dans lequel baignent les cellules. Par conséquent, seul l'HA se trouvant en extracellulaire de façon libre est dosé, tandis que celui qui serait attaché aux membranes plasmiques ne l'est pas.

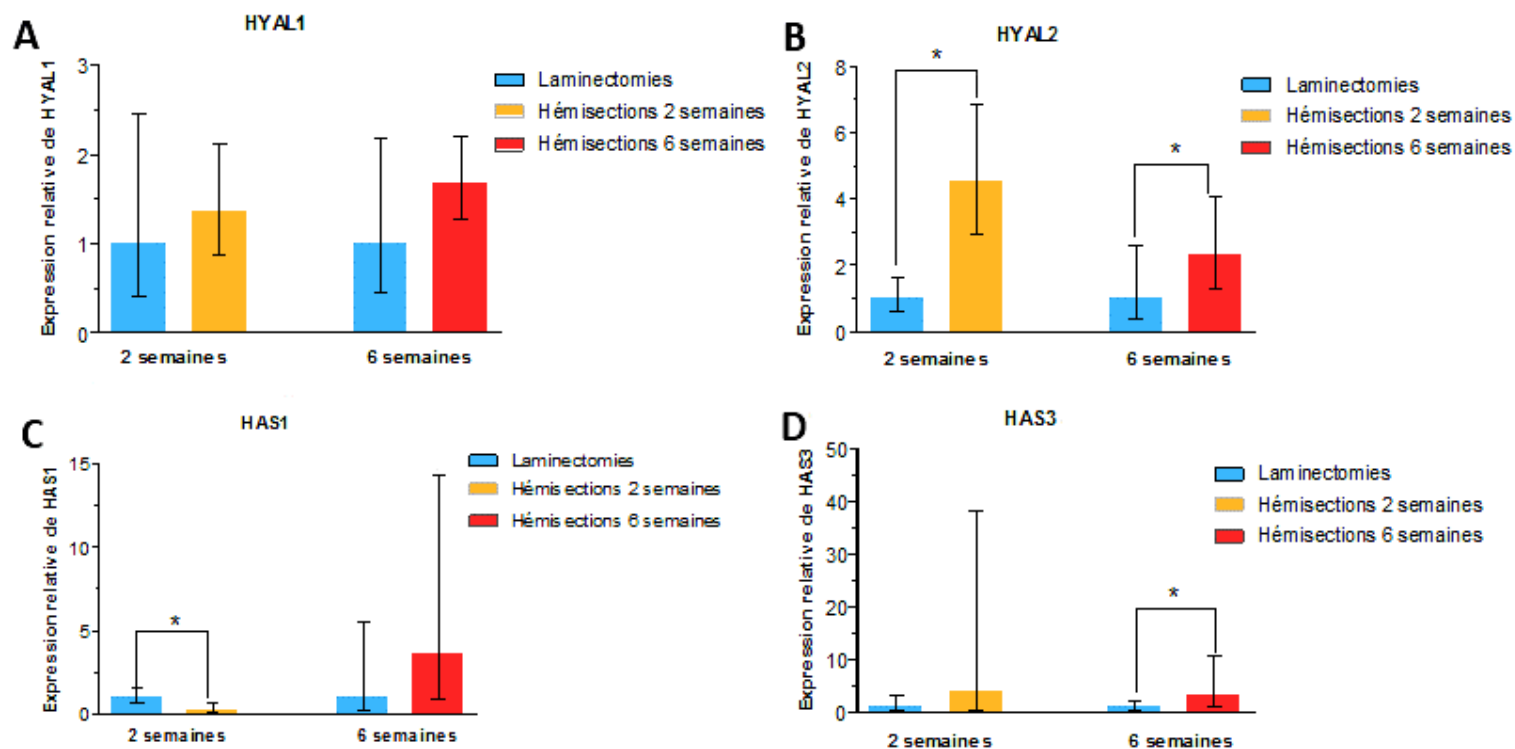


Figure 20 : Étude de l'expression relative des ARNm des hyaluronan synthases et des hyaluronidases dans l'épicentre des moelles épinières intactes et lésées.

Dans le but de déterminer l'expression relative des ARNm des enzymes prenant en charge l'HA, une extraction d'ARN a été réalisée, suivie par une reverse transcription en ADNc. Enfin, une PCR quantitative a été effectuée. Dans ce cadre, l'expression relative de *HYAL1* (A), *HYAL2* (B), *HAS1* (C) et *HAS3* (D) est étudiée chez les souris laminectomies 2 (n=4) et 6 (n=5) semaines ainsi que chez les souris hémisections 2 (n=4) et 6 (n=4) semaines. Les barres d'erreur représentent les médianes $\pm$ interquartiles (* = $p < 0.05$).

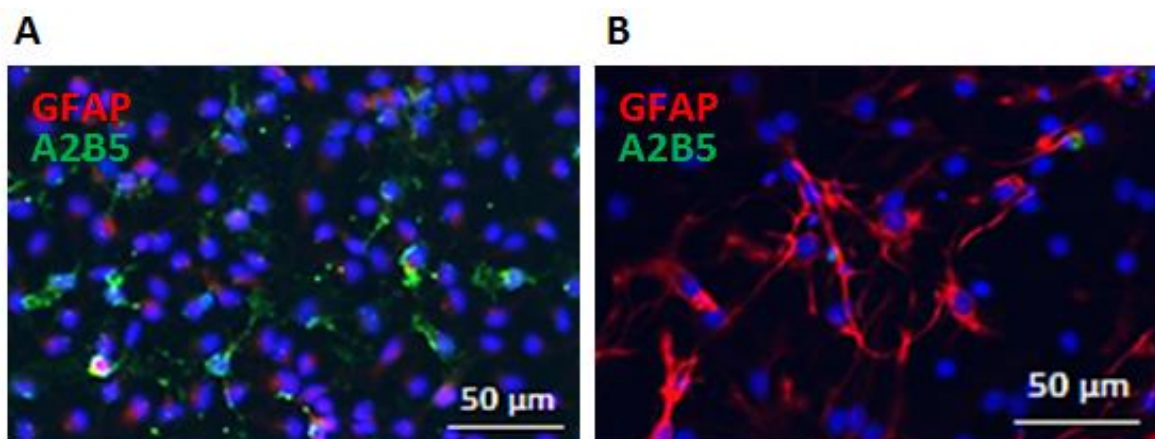


Figure 21 : Différenciation des cellules GRP en astrocytes.

Une double immunofluorescence a été réalisée afin de mettre en évidence les cellules GRP et les astrocytes. Les cellules positives pour A2B5 sont visibles en vert et la GFAP en rouge. Les noyaux sont visibles en bleu. L'image (A) montre les cellules dans un état indifférencié, en présence de FGF-2. L'image (B) a été prise 7 jours après le premier contact des cellules GRP avec le facteur BMP4.

DISCUSSION & CONCLUSION

Discussion & Conclusion

Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués après une lésion dans une moelle épinière est essentielle afin de découvrir des traitements efficaces. En effet, jusqu'à présent, seuls des traitements permettant de réduire la douleur et de limiter la réponse inflammatoire sont disponibles (par exemple, la Méthylprednisolone). Aucun traitement curatif n'existe de nos jours. (Kundi *et al.*, 2013 ; Silva *et al.*, 2014). Il est bien connu que l'environnement cellulaire joue un rôle capital dans des fonctions cellulaires diverses. Après une lésion de la moelle épinière, la MEC est perturbée durant la phase aigüe et la phase chronique. Certains protéoglycans contenus dans la MEC sont capables d'inhiber la repousse axonale (par exemple, les CSPGs), alors que d'autres la favorisent. De plus, ils peuvent être impliqués dans la stimulation de la formation de la cicatrice gliale (Bonneh-Barkay & Wiley, 2009 ; Khaing *et al.*, 2011 ; Silva *et al.*, 2014). C'est la raison pour laquelle il est nécessaire de générer des modèles animaux reproductibles et fiables qui miment les mécanismes physiopathologiques retrouvés chez l'humain. Ce projet s'est penché sur l'étude de l'implication de l'HA après l'induction d'une lésion dans la moelle épinière, et plus particulièrement dans un modèle murin d'hémisection médullaire.

1. Génération d'un modèle murin d'hémisection médullaire

Les rongeurs sont les animaux les plus utilisés dans l'étude des traumatismes médullaires, et plus particulièrement les rats. Toutefois, les souris sont de plus en plus utilisées dans l'étude des lésions de la moelle épinière. Ce projet s'est plutôt intéressé à ces dernières et ce, pour deux raisons principales. La première est qu'il existe de nombreuses similarités entre les lésions de la moelle épinière chez les souris et chez les humains (Sharif-Alhoseini & Rahimi-Movaghar, 2014). La seconde raison est que ce modèle animal permet l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés pour explorer la fonction de gènes spécifiques impliqués dans le métabolisme de l'HA après un trauma médullaire expérimental (par exemple, *HYAL1*^{-/-} et *HYAL2*^{-/-}). De plus, ces animaux sont facilement disponibles et sont faciles à manipuler (Marques *et al.*, 2009 ; Sharif-Alhoseini & Rahimi-Movaghar, 2014 ; Silva *et al.*, 2014).

Quel que soit le modèle animal utilisé (contusion, compression ou transection), aucun d'eux n'est capable de récapituler toutes les caractéristiques cliniques observées chez les humains (Kundi *et al.*, 2013). Par conséquent, chaque modèle possède des avantages et des inconvénients pour l'étude des traumatismes médullaires chez les humains. En ce qui concerne les transections totales, celles-ci consistent en une lacération de la moelle épinière (Kundi *et al.*, 2013). Bien que ce modèle permette d'évaluer la régénération axonale en raison du fait que tous les axones soient sectionnés, il possède quelques inconvénients. Tout d'abord, ce type de blessure est rarement observé chez les patients (33%) et est donc moins pertinent d'un point de vue clinique étant donné que la majorité des moelles épinières lésées conservent tout de même une certaine continuité du tissu à travers la zone de la lésion. De plus, une transection provoque l'apparition d'une cicatrice gliale très grande au niveau de l'épicentre. Les animaux ayant subi ce type de lésion de la moelle épinière nécessitent donc des soins post-opératoires intensifs. Une alternative à ce modèle est l'hémisection médullaire, qui est étudiée dans ce projet. Ce type de blessure coupe uniquement une moitié de la moelle épinière. De cette

façon, les animaux conservent une certaine continuité du tissu de la moelle épinière. En effet, les hémisections permettent notamment aux animaux de maintenir la fonction de leur vessie et de garantir une survie plus importante que les animaux ayant subi une transection. Les souris nécessitent donc moins de soins post-opératoires. De plus, une hémisection permet d'étudier les conséquences d'une lésion complète d'un côté de la moelle épinière et de le comparer au côté contralatéral à la lésion (Khaing *et al.*, 2011; Kundi *et al.*, 2013 ; Sharif-Alhoseini & Rahimi-Movaghar, 2014 ; Silva *et al.*, 2014).

Enfin, bien que les humains présentent le plus communément des blessures de la moelle épinière au niveau cervical, cette étude s'est focalisée sur les traumatismes médullaires au niveau thoracique. Ces derniers sont fiables et facilement reproductibles. Effectivement, au niveau cervical, les lésions de la moelle épinière mettent la vie des animaux en danger (Kundi *et al.*, 2013 ; Sharif-Alhoseini & Rahimi-Movaghar, 2014). Des blessures à ce niveau entraînent, par exemple, une dysfonction du système cardiovasculaire, du système gastro-intestinal ainsi que du diaphragme (ce qui provoque des problèmes respiratoires). De plus, elles conduisent à une paralysie des pattes antérieures et postérieures (Sharif-Alhoseini & Rahimi-Movaghar, 2014).

Notre étude a pu démontrer qu'un modèle murin d'hémisection médullaire au niveau T9 a pu être généré de façon fiable. En effet, comme il a été mis en évidence dans ce projet, les souris qui ont subi une hémisection du côté droit de la moelle épinière présentent une paralysie de la patte postérieure ipsilatéralement à la lésion. Dans les jours qui suivent, la récupération motrice des animaux est évaluée à l'aide de la BMS. Cette échelle de scores a permis de déterminer les différents stades de récupération des souris. Au bout de 7 jours après l'opération, elles ont toutes récupéré la coordination des pattes durant la marche et c'est après 15 jours que l'ensemble des souris présentent une démarche normale.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour justifier une récupération motrice aussi rapide chez les souris ayant subi une hémisection. Tout d'abord, il se pourrait que l'hémisection ne tranche pas l'entièreté du tractus cortico-spinal. En effet, chez les rongeurs, le tractus cortico-spinal est responsable de l'innervation motrice des membres antérieurs et postérieurs et est localisé dans les funiculi postérieurs. Par conséquent, si l'hémisection est réalisée de façon incomplète, les souris pourraient récupérer leur fonction motrice plus rapidement. Une autre hypothèse serait que lors de l'induction du trauma médullaire, une hémorragie est induite suite à la rupture des vaisseaux sanguins. Cet afflux de sang pourrait comprimer le tissu temporairement, dans lequel se trouvent certains axones qui ont été épargnés par l'hémisection. Lorsque l'hémorragie se termine, ces axones sains pourraient donc récupérer progressivement et participer à la récupération fonctionnelle rapide des animaux. Enfin, il est possible que des phénomènes de plasticité neuronale se mettent en place après l'hémisection médullaire. En effet, cette plasticité intervient toute la vie, dans les processus d'apprentissage durant le développement et lors de l'apparition d'une blessure dans le système nerveux central, et notamment dans la moelle épinière. Cette plasticité consiste en la réorganisation neuronale, en des réarrangements synaptiques ainsi qu'en la repousse des axones lésés (Silva *et al.*, 2014).

2. Caractérisation morphologique des lésions de la moelle épinière

À 2 et 6 semaines après l'induction d'un trauma médullaire, les analyses histologiques montrent une altération de l'architecture de la moelle épinière, ainsi qu'une perte neuronale importante. Ces caractéristiques morphologiques sont identiques à ce qui a été démontré dans une étude précédente, réalisée chez des souris femelles ayant subi une compression. De plus, cette étude a également mis en évidence la présence d'une infiltration cellulaire. D'après ces chercheurs, ce serait la conséquence de l'astroglie, pour former la cicatrice gliale. Cependant, ils ont également démontré la présence de fibroblastes, probablement issus des méninges (Marques *et al.*, 2009).

Dans le cadre de l'induction d'une hémisection médullaire, il se pourrait que ces cellules infiltrantes soient issues des méninges. En effet, lorsque la moelle épinière est sectionnée, les méninges le sont également, ce qui pourrait être à l'origine de cette infiltration de fibroblastes. En effet, il a été démontré que lorsqu'une hémisection est réalisée tout en laissant la dure-mère (composante des méninges) intacte, l'infiltration de cellules est fortement réduite au niveau du site de la lésion. De plus, les animaux dont la dure-mère est restée intacte présentent une récupération fonctionnelle plus importante que les autres souris. Étant donné que les fibroblastes proviennent des méninges, la cicatrice fibroblastique pourrait mimer la dure-mère au niveau de la lésion et par conséquent, empêcher la repousse axonale en formant une barrière physique (Seitz *et al.*, 2002).

De plus, des fibroblastes sont également retrouvés dans la moelle épinière, autour des larges vaisseaux sanguins. Lorsqu'un trauma médullaire survient, ces fibroblastes migrent au niveau du site de la lésion afin de participer à la formation de la cicatrice fibroblastique. Il semblerait que des macrophages hématogènes soient à l'origine de ce recrutement de fibroblastes (Zhu *et al.*, 2015). Ce phénomène de recrutement pourrait donc expliquer le fait qu'une cicatrice fibroblastique est présente (bien que très réduite) lorsqu'une hémisection est réalisée en laissant la dure-mère intacte (Seitz *et al.*, 2002 ; Zhu *et al.*, 2015).

Enfin, les péricytes semblent également présents dans l'infiltrat cellulaire. En effet, 3 à 5 jours après la blessure, les vaisseaux sanguins se reforment et une augmentation de la densité des péricytes est mise en évidence. Toutefois, au niveau de la zone lésée, des péricytes perdent leur contact avec les vaisseaux sanguins et prolifèrent pour former le tissu cicatriciel. Dans la lésion, le nombre maximal de péricytes est observé 2 semaines après le trauma et diminue après 4 mois. Ces cellules paraissent localisées plus particulièrement dans le centre de l'infiltrat cellulaire (Göritz *et al.*, 2011).

3. Formation d'une cicatrice gliale

Afin de s'assurer que l'infiltration cellulaire observée dans l'épicentre des lésions représente également une astroglie, un marquage de la GFAP (un marqueur spécifique des astrocytes) a été réalisé. Chez les souris laminectomies, des astrocytes protoplasmiques sont présents de manière quiescente dans la substance grise et des astrocytes fibreux sont visibles dans la substance blanche. En revanche, 2 semaines après l'induction d'un trauma médullaire, des astrocytes hypertrophiés possédant un marquage de la GFAP plus intense sont observés, du

côté ipsilatéral à la lésion. Par conséquent, cela signifie que ces astrocytes sont activés au niveau de la lésion. La présence de ces astrocytes très nombreux et activés prouve qu'une cicatrice gliale est formée dans la zone lésée. Dans les moelles épinières observées 6 semaines après le trauma médullaire, le marquage de la GFAP est plus diffus et les astrocytes sont plus rares. De plus, lorsqu'ils sont mis en évidence, ceux-ci présentent un marquage moins intense de la GFAP. Cela suggère que les astrocytes sont moins activés que précédemment et ne prolifèrent plus. Il est important de noter que l'infiltration cellulaire ne contient pas d'astrocytes, comme nous l'avons démontré. Cette dernière observation concorde avec une étude de 2002, dans laquelle des souris ayant subi une hémisection médullaire ne présentent pas d'astrocytes au niveau de l'infiltrat cellulaire. En revanche, ils sont présents autour de la lésion (Seitz *et al.*, 2002).

Lorsque ces observations sont analysées ensemble, nous pouvons en conclure que la cicatrice gliale semble perdurer dans le temps. Toutefois, au vu des changements morphologiques des astrocytes, il semble que cette cicatrice évolue au cours du temps. Par conséquent, nous pouvons émettre une hypothèse selon laquelle, 2 semaines après le trauma médullaire, les astrocytes activés formeraient la cicatrice gliale. Cette activation pourrait se produire en réponse à l'inflammation présente au niveau de la lésion. En effet, les astrocytes possèdent le récepteur CD44 qui peut notamment interagir avec des cytokines inflammatoires (Vigetti *et al.*, 2014). Avec le temps, lorsque la cicatrice gliale est formée, la réduction du nombre d'astrocytes et la diminution de leur activation suggèrent qu'ils ne sont plus nécessaires pour maintenir cette cicatrice. Cette inactivation est peut-être la conséquence de la disparition de l'inflammation.

L'HA pourrait également jouer un rôle dans l'activation des astrocytes après une lésion et dans leur inactivation au cours du temps. En effet, leur activation pourrait être la conséquence d'une dégradation de l'HA de haut poids moléculaire, qui favorise la quiescence des astrocytes (Struve *et al.*, 2005). Avec le temps, les astrocytes semblent s'inactiver et désertent la zone de la lésion, bien que la cicatrice gliale soit toujours bien présente. Ceci pourrait être dû au fait que l'HA de haut poids moléculaire est produit de façon excessive après l'induction de la lésion, tout comme ce qui a été observé dans des moelles épinières de rats (Struve *et al.*, 2005).

Afin de s'assurer que les astrocytes prolifèrent lors de l'induction d'une lésion et que cette prolifération s'atténue avec le temps, il serait intéressant de réaliser un double immunomarquage. Celui-ci se réaliserait avec un anticorps qui reconnaît la GFAP et un marqueur de la prolifération cellulaire (Ki67, PCNA ou après injection de BrdU).

4. Implication de la microglie

Chez les souris laminectomies, la microglie est présente de façon quiescente dans la moelle épinière. En revanche, lorsqu'une hémisection est induite, elle s'active au niveau de la zone lésée. Tout comme les astrocytes, elle semble toutefois moins activée chez les souris lésées 6 semaines. Cette observation renforce l'hypothèse précédente selon laquelle la cicatrice gliale serait formée au moment de l'hémisection et qu'elle reste présente au cours du temps, bien que ne nécessitant plus l'action des astrocytes. Cette diminution de l'activation de la

microglie serait peut-être le résultat d'une production d'HA de bas poids moléculaire. En effet, une étude a démontré que les tétrasaccharides d'HA sont capables de réduire l'accumulation de cellules positives pour Iba1 lorsqu'ils sont injectés au niveau d'une blessure médullaire (Wakao *et al.*, 2011).

Le rôle que joue la microglie lorsqu'un trauma médullaire survient est encore inconnu. Toutefois, étant donné l'activité de phagocytose des microgliocytes, ils pourraient intervenir dans le nettoyage des débris produits par la lésion et l'inflammation.

De même que les astrocytes, les cellules de la microglie ne co-localisent pas avec l'HA. Elles ne seraient donc pas impliquées dans sa synthèse. Toutefois, afin de confirmer cette observation, il serait intéressant d'en étudier la production *in vitro* et de doser l'HA soluble se trouvant dans le milieu de culture.

5. L'HA dans les moelles épinières intactes et lésées

Il a été démontré que les glycosaminoglycans peuvent jouer un rôle capital dans la régénération axonale après l'induction d'un trauma médullaire. Par exemple, le chondroïtine sulfate est connu pour être un puissant inhibiteur de la repousse axonale. Au contraire, l'héparan sulfate en est un promoteur puissant (Takeuchi *et al.*, 2013). Étudier l'implication de l'HA après l'induction d'une hémisection médullaire est donc d'un grand intérêt.

Avant tout, un dosage de l'HA a été réalisé afin de déterminer les quantités d'HA présentes après une laminectomie ou une hémisection à 2 et 6 semaines après l'opération. Cette expérience a permis de mettre en évidence une augmentation statistiquement significative de l'HA dans les moelles épinières lésées des animaux 6 semaines, par rapport aux animaux 2 semaines. Ces observations concordent avec celles réalisées dans une étude précédente effectuée sur des rats. Dans cette dernière, les chercheurs ont pu mettre en évidence que l'HA de haut poids moléculaire est dégradé en HA de bas poids moléculaire après l'induction d'une lésion dans une moelle épinière de rat et ce, 3 jours après l'opération. Ensuite, l'HA de haut poids moléculaire est produit de façon très importante 4 semaines après le trauma médullaire. De cette manière, il inhibe probablement l'activation des astrocytes lorsque la cicatrice gliale est formée. Il semblerait que ce sont les astrocytes eux-mêmes qui synthétisent l'HA qui induit leur inactivation (Struve *et al.*, 2005).

Ensuite, afin de caractériser la distribution de ce glycosaminoglycan dans les moelles épinières intactes et lésées, un marquage à l'aide d'une peroxydase a été effectué. Chez les souris contrôles, l'HA est présent de façon homogène à la fois dans la substance blanche et la substance grise de la moelle épinière. De plus, il est davantage concentré dans les filets périneuronaux, ainsi que le long des dendrites proximales. En ce qui concerne les animaux dont la moelle épinière a été lésée, l'HA semble s'accumuler autour de la zone de la lésion, à proximité des cellules infiltrantes. En revanche, il n'est plus présent autour des corps cellulaires de neurones restants ainsi qu'autour des dendrites proximales. Cela signifie donc que le filet périneuronal de ces cellules nerveuses est désorganisé.

6. Implication des astrocytes dans la production d'HA

Afin de déterminer si les astrocytes sont capables de produire de l'HA *in vivo*, une double immunofluorescence a été réalisée sur les coupons de moelle épinière pour marquer la GFAP et l'HA. Lorsque le marquage fluorescent des astrocytes et de l'HA sont fusionnés, aucune co-localisation n'est visible chez les souris laminectomies. Chez les souris hémisections 2 et 6 semaines, l'HA semble s'accumuler autour de la zone de la lésion pour former une sorte de coque qui entoure cette dernière. En revanche, il n'est pas présent dans la zone infiltrée par les nombreuses cellules. En ce qui concerne le marquage fluorescent de la GFAP, celui-ci présente des variations entre les deux groupes d'animaux lésés. Chez les souris lésées 2 semaines, les astrocytes activés sont localisés autour de la coque formée par l'HA et un marquage plus diffus de la GFAP est observé dans cette dernière. Toutefois, aucune co-localisation n'est observée, ce qui suggère que l'HA n'est pas produit par les astrocytes. Chez les souris hémisections 6 semaines, les astrocytes localisés autour de la coque d'HA semblent moins nombreux et moins activés que ceux retrouvés chez les souris lésées 2 semaines. De plus, le marquage plus diffus de la GFAP semble être passé au-delà de la coque d'HA pour rejoindre la zone hypercellularisée. Dans cette coque d'HA, le marquage de l'HA et la GFAP co-localisent partiellement. Ces différentes observations suggèrent que certains astrocytes migrent au cours du temps vers la zone lésée hypercellularisée et néo-synthétisent de l'HA 6 semaines après une hémisection médullaire. Cet HA nouvellement produit pourrait participer à l'inactivation des astrocytes (Struve *et al.*, 2005).

In vitro, des astrocytes différenciés à partir de précurseurs gliaux semblent capables de produire de l'HA, mais en faible quantité et de manière équivalente en condition normale ou après stimulus mécanique. Toutefois, ces résultats sont à prendre avec précaution étant donné que l'expérience n'a pu être réalisée qu'une seule fois. De plus, un dosage de l'HA soluble se trouvant dans le milieu de culture ne représente pas la quantité totale d'HA produit par les astrocytes. En effet, l'HA peut rester attaché aux membranes plasmiques.

Étant donné que nos résultats à propos de la production d'HA par les astrocytes *in vitro* sont préliminaires, il serait intéressant de recommencer cette expérience dans de meilleures conditions. Si l'HA reste attaché aux membranes plasmiques des cellules en culture, le dosage de l'HA soluble ne peut donner qu'une vague idée de la quantité qui est produite par les astrocytes. Afin d'avoir une idée plus claire du métabolisme de l'HA dans des conditions normales ou lors de l'induction d'un stress, il serait intéressant d'étudier l'expression relative des hyaluronidases et des hyaluronan synthases *in vitro*.

Il serait également intéressant d'étudier la synthèse de l'HA par d'autres cellules, telles que les oligodendrocytes, la microglie ou encore les neurones. Pour ce faire, une double immunofluorescence serait nécessaire afin de mettre en évidence l'HA avec des marqueurs spécifiques des cellules à étudier. De plus, des études *in vitro* seraient également d'un grand intérêt.

7. Expression des gènes codant pour les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'HA

Étant donné que l'HA semble s'accumuler au niveau de la lésion chez les souris 6 semaines, à proximité de la cicatrice gliale, il est intéressant de déterminer si cette accumulation est le résultat d'une expression augmentée des hyaluronan synthases ou d'une expression diminuée des hyaluronidases. Pour ce faire, une étude de l'expression relative des ARNm des hyaluronan synthases et des hyaluronidases a été réalisée.

Chez les souris 2 semaines, *HYAL2* est davantage exprimée dans les moelles épinières lésées que dans les moelles épinières intactes. En revanche, *HAS1* est moins exprimée chez les souris hémisections que chez les souris laminectomies. Cela signifie donc que l'HA de haut poids moléculaire est dégradé de façon plus importante tandis que, au contraire, sa synthèse est diminuée. Ces résultats mis ensemble, il semblerait donc que l'HA de haut poids moléculaire disparaît de la moelle épinière 2 semaines après l'induction de la lésion. Ces observations peuvent être mises en relation avec l'activation des astrocytes qui a été mise en évidence dans ce projet. Par conséquent, cela confirme les constatations réalisées dans l'étude de Struve *et al.* (2005), qui suggèrent que la dégradation de l'HA de haut poids moléculaire permet d'activer les astrocytes dans la zone lésée.

Chez les souris 6 semaines, *HYAL2* est toujours plus exprimée dans les moelles épinières lésées que dans les moelles épinières intactes. L'HA de haut poids moléculaire continue donc à être dégradé 6 semaines après le trauma médullaire. Toutefois, de l'HA de bas poids moléculaire est généré, peut-être pour tenter de reformer les filets périneuraux autour des corps cellulaires neuronaux restants, comme le suggère la surexpression de *HAS3*. En effet, il a été démontré que *HAS3* est exprimée par les neurones de la moelle épinière qui possèdent ces structures (Galtrey *et al.*, 2008).

Cette continuelle dégradation de l'HA de haut poids moléculaire en plus petits fragments ainsi que la synthèse d'HA de bas poids moléculaire pourrait signifier que ce dernier type d'HA est nécessaire pour la réparation du tissu. En effet, une étude récente a démontré que l'ajout d'un tétrasaccharide d'HA dans des moelles épinières lésées de rats favorise la repousse axonale (Wakao *et al.*, 2011).

Dans le but de confirmer les résultats obtenus lors de l'étude de l'expression relative des enzymes prenant en charge l'HA, il serait intéressant de déterminer quel type d'HA (HA de haut poids moléculaire, de poids moléculaire intermédiaire ou de bas poids moléculaire) est présent dans des moelles épinières intactes et lésées à 2 et 6 semaines après l'opération et de réaliser un dosage d'activité des hyaluronidases. Cela permettrait également de déterminer le rôle exact de l'HA aux différents moments après l'hémisection de la moelle épinière, ainsi que son implication dans l'activation des astrocytes. En effet, il serait intéressant de déterminer si les observations réalisées chez le rat en ce qui concerne l'activation des astrocytes lors de la dégradation de l'HA de haut poids moléculaire sont aussi valables pour les modèles murins (Struve *et al.*, 2005).

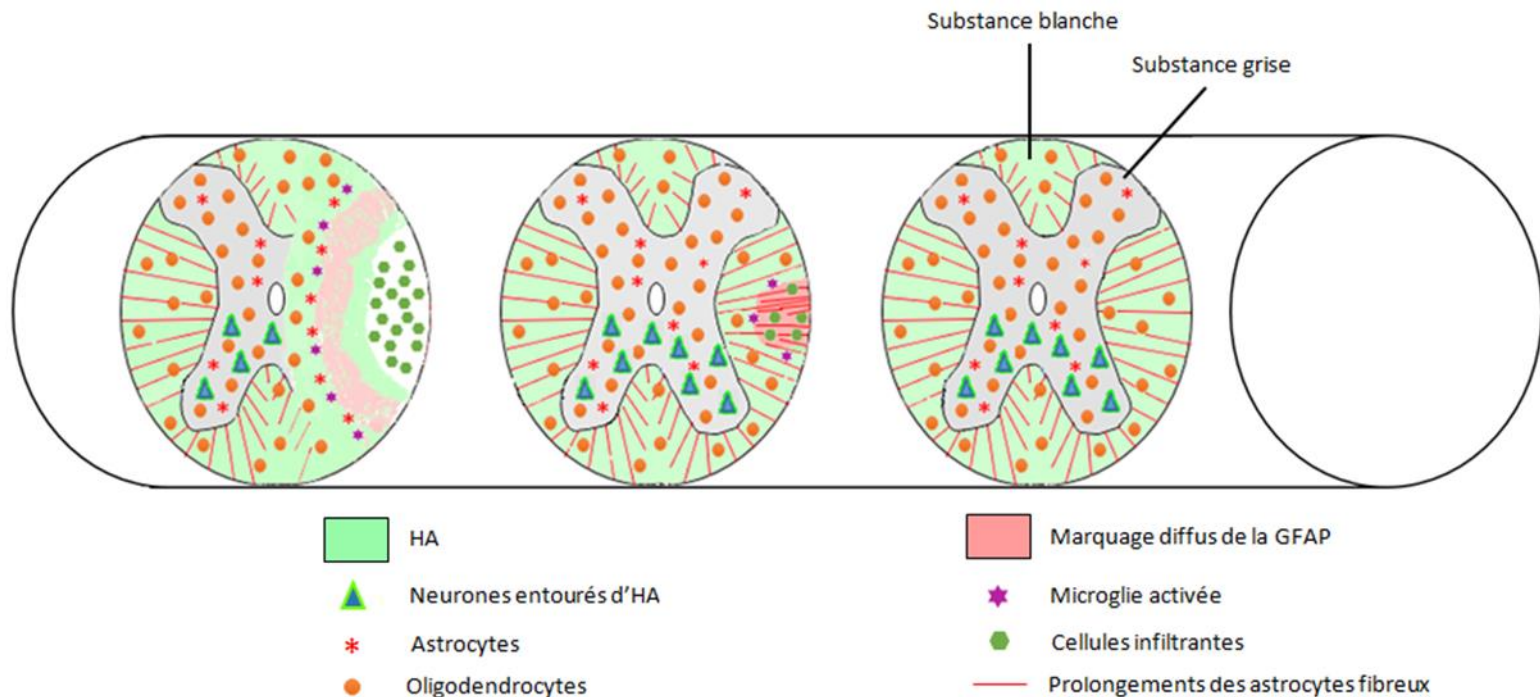


Figure 22 : Représentation de la moelle épinière après l'induction d'une hémisection.

Les différents événements survenant dans la moelle épinière après un trauma médullaire sont schématisés. La représentation de gauche montre l'épicentre de la lésion, celle du milieu représente un niveau plus éloigné (rostral ou caudal) et celle de droite représente une zone très éloignée (rostrale ou caudale) qui est intacte. Les événements qui sont schématisés sont : l'activation des astrocytes et leur multiplication, l'activation de la microglie, l'infiltration cellulaire, la mort neuronale ainsi que la formation d'une coque d'HA autour de la zone lésée. La zone légèrement plus éloignée de l'épicentre présente une activation réduite de la microglie et des astrocytes. De plus, seules quelques cellules infiltrantes sont présentes et la coque d'HA n'est pas visible. Dans les zones très éloignées de l'épicentre, aucun changement morphologique n'est observé par rapport aux animaux contrôles. En effet, les oligodendrocytes sont localisés partout dans la moelle épinière et les neurones sont bien présents. De plus, les astrocytes protoplasmiques et fibreux sont dans un état quiescent, de même que la microglie. Le côté contralatéral à la lésion est totalement épargné lorsqu'une hémisection est induite.

8. Conclusion

En conclusion, un modèle murin d'hémisection médullaire fiable a été généré et ce, dans le but d'étudier l'évolution de l'HA dans la moelle épinière à 2 et 6 semaines après l'induction du trauma. Cela a permis de mettre en évidence que l'HA est augmenté de façon significative chez les animaux lésés 6 semaines après l'opération. Cela suggère donc qu'il joue un rôle au niveau de la lésion, tout comme d'autres glycosaminoglycans tel que le chondroïtine sulfate par exemple. Lorsque sa distribution est analysée dans l'épicentre, il semble que l'HA s'accumule autour de la lésion pour former une coque, à proximité de la cicatrice gliale formée par les astrocytes activés. La microglie s'active également autour de cette coque d'HA et les neurones situés du côté ipsilatéral à la lésion sont majoritairement morts. Une infiltration cellulaire est observée dans la lésion, dans une zone où l'HA est absent. Ces cellules ne semblent donc pas être à l'origine de la synthèse de ce glycosaminoglycan. Dans les zones plus éloignées de l'épicentre, une infiltration cellulaire est également observée mais de moindre importance, de même que l'activation de la microglie et des astrocytes. À ce niveau, la coque d'HA n'est pas présente (Figure 22). Les analyses de l'expression relative des hyaluronidases et des hyaluronan synthases ont révélés qu'Hyal-2 est fortement exprimée à la fois à 2 et 6 semaines après le trauma médullaire, tandis que l'HA de bas poids moléculaire est synthétisé par Has3. Cela suggère que l'HA de bas poids moléculaire prédomine après l'induction d'une lésion de la moelle épinière. Toutefois, il est nécessaire d'approfondir ces recherches, en déterminant le poids moléculaire de l'HA présent à 2 et 6 semaines après l'hémisection. En effet, ce glycosaminoglycan possède diverses fonctions suivant sa taille. La détermination de son poids moléculaire permettra donc de mieux comprendre son implication dans la moelle épinière après un traumatisme. Enfin, ce projet n'a pas pu mettre en évidence de façon claire que les astrocytes synthétisent de l'HA en condition de stress. Par conséquent, des questions persistent quant à savoir quelles sont les cellules qui sont capables de produire l'HA lorsqu'une lésion de la moelle épinière survient.

Toutefois, des chercheurs tentent déjà de mettre au point des thérapies en modulant la présence de l'HA dans les moelles épinières lésées. Dans une étude, des scientifiques se sont basés sur le phénomène d'inhibition de l'activation des astrocytes par l'HA de haut poids moléculaire (Struve *et al*, 2005). En effet, pour ce faire, une hémisection a été réalisée sur des rats femelles et un hydrogel composé d'HA de haut poids moléculaire a été ajouté à l'endroit du trauma. De cette manière, ils ont pu démontrer que ce type d'HA est capable de limiter le dépôt de CSPGs (qui sont des inhibiteurs puissants de la repousse axonale) et l'activation des astrocytes. Cela permet de réduire la formation de la cicatrice gliale et donc de favoriser la repousse axonale (Khaing *et al.*, 2011).

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

BASSO D.M., FISHER L.C., ANDERSON A.J., JAKEMAN L.B., McTIGUE D.M. & POPOVICH P.G. (2006). Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *Journal of Neurotrauma*, 23 : 635-659.

BONNEH-BARKAY D. & WILEY C.A. (2009). Brain extracellular matrix in neurodegeneration. *Brain Pathology*, 19 : 573-585.

CSOKA A.B., FROST G.I. & STERN R. (2001). The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biology*, 20 : 499-508.

DE MEDINACELI L., An anatomical landmark for procedures on rat thoracic spinal cord. (1986). *Experimental Neurology*, 91: 404-408.

FRASER J.R.E., LAURENT T.C. & LAURENT U.B.G. Hyaluronan : its nature, distribution, functions and turnover. (1997). *Journal of Internal Medicine*, 242 : 27-33.

GALTREY C.M., KWOK J.C.F., CARULLI D., RHODES K.E. & FAWCETT J.W. (2008). Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 27 : 1373-1390.

GÖRITZ C., DIAS D.O., TOMILIN N., BARBACID M., SHUPLIAKOV O. & FRISEN J. (2011). A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science*, 333 : 238-242.

ITANO N. & KIMATA K. (2002). Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*, 54 : 195-199.

ITO D., IMAI Y., OHSAWA K., NAKAJIMA K., FUKUUCHI Y. & KOHSAKA S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research*, 57 : 1-9.

KHAING Z.Z., MILMAN B.D., VANSCHOY J.E., SEIDLITS A.K., GRILL R.J. & SCHMIDT C.E. (2011). *Journal of Neural Engineering*, 8 : 046033.

KUNDI S., Bicknell R. & AHMED Z. (2013). Spinal cord injury : current mammalian models. *American Journal of Neuroscience*, 4 : 1-12.

LI K., NICAISE C., SANNIE D., HALA T.J., JAVED E., PARKER J.L., PUTATUNDA R., REGAN K.A., SUAIN V., BRION J-P. RHODERICK F., WRIGHT M.C., POULSEN D.J. & LEPORE A.C. (2014). Overexpression of the astrocyte glutamate transporter GLT1 exacerbates phrenic motor neuron degeneration, diaphragm compromise, and forelimb motor dysfunction following cervical contusion spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 34: 7622-38.

MARQUES S.A., GARCEZ V.F., DEL BEL E.A. & MARTINEZ A.M.B. (2009). A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: Morphological and functional assessment. *Journal of Neuroscience Methods*, 177: 183-193.

PARENT A. & CARPENTER M.B. (1996). Carpenter's human neuroanatomy. *Williams & Wilkins*, 9^{ème} edition.

POUMAY Y. (2015). Histologie générale - II. *Université de Namur*.

RUOSLAHTI E. (1996). Brain extracellular matrix. *Glycobiology*, 6 : 489-492.

SEITZ A., AGLOW E. & HEBER-KATZ E. (2002). Recovery from spinal cord injury: a new transection model in the C57Bl/6 mouse. *Journal of Neuroscience Research*, 67 : 337-345.

SHARIF-ALHOSEINI M. & RAHIMI-MOVAGHAR V. (2014). Animal models in traumatic spinal cord injury, topics in paraplegia.

SILVA N.A., SOUSA N., REIS R.L. & SALGADO A.J. (2014). From basics to clinical : A comprehensive review on spinal cord injury. *Progress in Neurobiology*, 114: 25-57.

STERN R. (2003). Devising a pathway for hyaluronan catabolism : are we there yet ?. *Glycobiology*, 13 : 105-115.

STERN R. (2004). Hyaluronan catabolism : a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology*, 83 : 317-325.

STRUVE J., MAHER P.C., LI Y-Q., KINNEY S., FEHLINGS M.G., KUNTZ C. 4th & SHERMAN L.S. (2005). Disruption of the hyaluronan-based extracellular matrix in spinal cord promotes astrocyte proliferation. *Glia*, 52: 16-24.

TAKEUCHI K., YOSHIOKA N., ONAGA S.H., WATANABE Y., MIYATA S., WADA Y., KUDO C., OKADA M., OHKO K., ODA K., SATO T., YOKOYAMA M., MATSUSHITA N., NAKAMURA M., OKANO H., SAKIMURA K., KAWANO H., KITAGAWA H. & IGARASHI M. (2013). Chondroitin sulphate N-acetylgalactosaminyl-transferase-1 inhibits recovery from neural injury. *Nature Communications*, 4 : 2740.

VIGETTI D., KAROUSOU E., VIOLA M., DELEONIBUS S., DE LUCA G. & PASSI A. (2014). Hyaluronan : Biosynthesis and signalling. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840 : 2452-2459.

WAKAO N., IMAGA S., ZHANG H., TAUCHI R., MURAMOTO A., NATORI T., TAKESHITA S., ISHIGURO N., MATSUYAMA Y. & KADOMATSU K. (2011). Hyaluronan oligosaccharides promote functional recovery after spinal cord injury in rats. *Neurosciences Letters*, 488 : 299-304.

ZHU Y., SODERBLOM C., KRISHNAN V., ASHBAUGH J., BETHEA J.R. & LEE J.K. (2015). Hematogenous macrophage depletion reduces the fibrotic scar and increases axonal growth after spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*, 74 : 114-125.