

PIERRE CORDEAU JR

IMAGERIE IN VIVO DE LA RÉPONSE
NEUROINFLAMMATOIRE : LA RÉPONSE ASTROCYTAIRE
SUITE À UNE ISCHÉMIE CÉRÉBRALE.

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en neurobiologie
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2008

Résumé

Suite à un traumatisme cérébral, l'activation des astrocytes est impliquée dans la réponse cellulaire inflammatoire. Le passage de la forme quiescente à la forme activée des astrocytes est associé à l'augmentation marquée du filament intermédiaire de type GFAP (glial fibrillary acidic protein). Des études utilisent la protéine GFAP comme marqueur indirect des dommages neuronaux sans toutefois connaître l'implication réelle des astrocytes dans le processus inflammatoire suite à une ischémie cérébrale. C'est pourquoi ce projet a pour but de clarifier la dynamique et le rôle de l'activation des astrocytes suite à une ischémie cérébrale. Pour ce faire, nous avons mis au point un modèle murin pour étudier de façon longitudinale la réponse inflammatoire *in-vivo*.

Abstract

Cerebral ischemia is associated with strong inflammatory and glial responses that may contribute to neuronal damage and/or provide trophic support to injured neurons. Reactive astrogliosis is one of the key components of the cellular responses to CNS injuries and the passage from the quiescent to reactive astrocytes is associated with an upregulation of the intermediate filament, glial fibrillary acidic protein (GFAP). Although upregulation of the GFAP has been widely used as an alternative marker of neuronal damage, the functional significance and the dynamics of the astrocytic response surrounding focal cerebral infarcts is still unclear. Therefore, to further clarify the role of astrocytes in cerebral ischemia we developed a model system for in vivo, non-invasive analysis of astrocytes activation in the brain.

Avant-Propos

Je tiens tout d'abord à remercier vivement Jasna Kriz de m'avoir pris sous son aile et d'avoir cru en mes capacités à mener à terme un projet de recherche qui touchait peu mon domaine d'étude. De plus, ce laboratoire m'a donné l'opportunité de participer à des congrès d'ampleur nationale et internationale. Lors de ma maîtrise, j'ai acquis de nouvelles techniques de laboratoire, j'ai pu y affûter mon esprit critique et parfaire mes connaissances dans le domaine des filaments intermédiaires, des neuropathologies et des hormones stéroïdes.

J'aimerais aussi remercier mes collègues de travail qui ont pris le temps de m'enseigner et de m'expliquer ce que je connaissais qu'en partie ou très peu. Un gros merci à Mélanie, Makoto, Yuan, Gen, Gene, Renée, Flo, Florence, Samer et Frank. J'aimerais aussi noter le support moral et financier de ma famille ainsi que l'amour inconditionnel de Karine.

De plus, il ne faut pas passer sous silence le dévouement des souris GFAP-Fluc pour l'avancement de la science, sans elles tout ceci ne serait possible.

L'article de ce mémoire a été accepté et sera publié sous peu dans *Stroke*. J'agis à titre de co-auteur principal avec Mélanie Lalancette-Hébert. Dans cette étude, j'ai effectué la prise des données expérimentales ainsi que le traitement des souris. L'analyse fut effectuée en collaboration avec Mélanie. Ensemble, nous avons élaboré et mis sur pieds le protocole de recherche pour mener à bien cette étude. Il ne faut pas oublier l'apport de Mr. Weng qui a effectué les chirurgies sur les animaux.

À Suki...

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-Propos.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des annexes.....	viii
Interprétation des frottis vaginaux.....	viii
Réaction de bioluminescence simplifiée et schématisée.....	viii
Chapitre 1.....	9
Introduction.....	9
1.1 L'ischémie cérébrale.....	9
1.1.1 L'inflammation.....	13
1.2 Les astrocytes.....	15
1.2.1 Types et morphologies.....	15
1.2.2 Les rôles des astrocytes dans le système nerveux central.....	16
1.2.3 Les astrocytes lors de l'ischémie.....	18
1.2.4 L'activation des astrocytes lors de l'ischémie.....	19
1.3 Les oestrogènes.....	21
1.3.1 Le rôle des oestrogènes dans l'ischémie cérébrale.....	24
1.3.2 Les oestrogènes, leur effet sur les astrocytes.....	26
1.4 Les traitements hormonaux.....	27
1.5 Techniques utilisées.....	28
1.5.1 Le cycle oestral chez la souris.....	28
1.5.2 Technique d'imagerie <i>in vivo</i> utilisée.....	29
1.6 Objectifs du projet et hypothèses de travail.....	32
Chapitre 2.....	33
2.1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE.....	33
2.2 TITRE.....	34
2.3 AUTEURS.....	34
2.4 ABSTRACT.....	34
2.5 INTRODUCTION.....	35
2.6 MATERIAL AND METHODS.....	36
Transgenic mice.....	36
Surgical procedures.....	37
Vaginal smears and hormone detection.....	37
In vivo bioluminescence imaging.....	37
Size of Infarct.....	38
Immunocytochemistry and tissue collection.....	38
2.7 RESULTS.....	39
Real-time imaging reveals estrogen-dependent modulation of GFAP signals in female mice.....	39
Spatio-temporal distribution of bioluminescent signals in GFAP-luc mice correlates with GFAP immunoreactivity.....	40

Chronic lack of estrogen increases astrocyte response to ischemic injury in female mice.....	41
GFAP up-regulation in cerebral ischemia differentially correlates with neuronal damage in male and female mice.....	41
2.8 DISCUSSION.....	42
2.9 ACKNOWLEDGEMENTS.....	44
2.10 References.....	45
2.11 FIGURES.....	49
FIGURE 1.....	49
FIGURE 2.....	50
FIGURE 3.....	51
FIGURE 4.....	52
FIGURE 5.....	52
2.12 FIGURE LEGENDS.....	53
CHAPITRE 3.....	55
Conclusion.....	55
Bibliographie.....	60
Annexes 1.....	64
Interprétation des frottis vaginaux.....	64
Réaction de bioluminescence simplifiée et schématisée.....	66
La schématisation complexe se trouve sous cette forme :.....	66

Liste des figures

Figure 1. Cascade des évènements dommageables et évolution de la région lésée à la suite d'une ischémie cérébrale.

Figure 2. Diagramme des évènements majeurs après une ischémie cérébrale transitoire.

Figure 3. Mécanisme moléculaire résumant la diapédèse.

Figure 4. Mécanisme de biosynthèse du 17 β -estradiol.

Figure 5. Activation directe d'un gène par une hormone stéroïde.

Figure 6. Conversion de l'énergie chimique en énergie lumineuse.

Liste des annexes

Interprétation des frottis vaginaux.

Réaction de bioluminescence simplifiée et schématisée.

Chapitre 1

Introduction

Un homme sur six subira au moins un accident vasculaire durant sa vie. Dans les pays industrialisés, les décès engendrés par les accidents vasculaires cérébraux se classent au troisième rang derrière les problèmes cardiaques et toutes les formes de cancers confondus (Nedergaard, 2005). En plus de causer chaque année environ 500 000 morts seulement aux États-Unis, les accidents vasculaires entraînent des handicaps majeurs chez les personnes atteintes. Ainsi, les accidents cérébraux vasculaires engendrent des coûts sociaux astronomiques tant économiques que familiaux (Durukan, 2007). De plus, l'espérance de vie de la population augmente laissant présager que les accidents cérébraux vasculaires vont eux aussi augmenter, tout comme les conséquences négatives s'y rattachant. C'est pourquoi la recherche dans le domaine doit se poursuivre avec encore plus d'ardeur.

1.1 L'ischémie cérébrale

Afin d'étudier les mécanismes pathophysiologiques de l'ischémie cérébrale, plusieurs modèles sont utilisés bien qu'ils miment plus ou moins bien ce qui se produit chez l'homme (Stoll, 1998). Par exemple, selon que l'occlusion soit partielle ou permanente, les mécanismes pathologiques et les zones affectées peuvent varier.

L'ischémie cérébrale focale transitoire se définit comme étant la diminution ou l'arrêt transitoire de l'apport de sang irrigant une région du cerveau desservie par une artère donnée. La zone infarctée se nomme le foyer qui est entouré par une région secondaire nommée penombra. Au niveau du foyer, la mort cellulaire est plus importante que dans la penombra (Stoll, 1998). Il s'en suit alors une chaîne d'évènements pathophysiologiques qui vont évoluer dans le temps et l'espace (Figure 1). Les mécanismes principaux qui font partie de cette chaîne d'évènements sont: l'excitotoxicité, une vague de dépolarisation, la génération de radicaux libres, la perturbation de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique, l'inflammation ainsi que la mort cellulaire (Dirnagl, 1999).

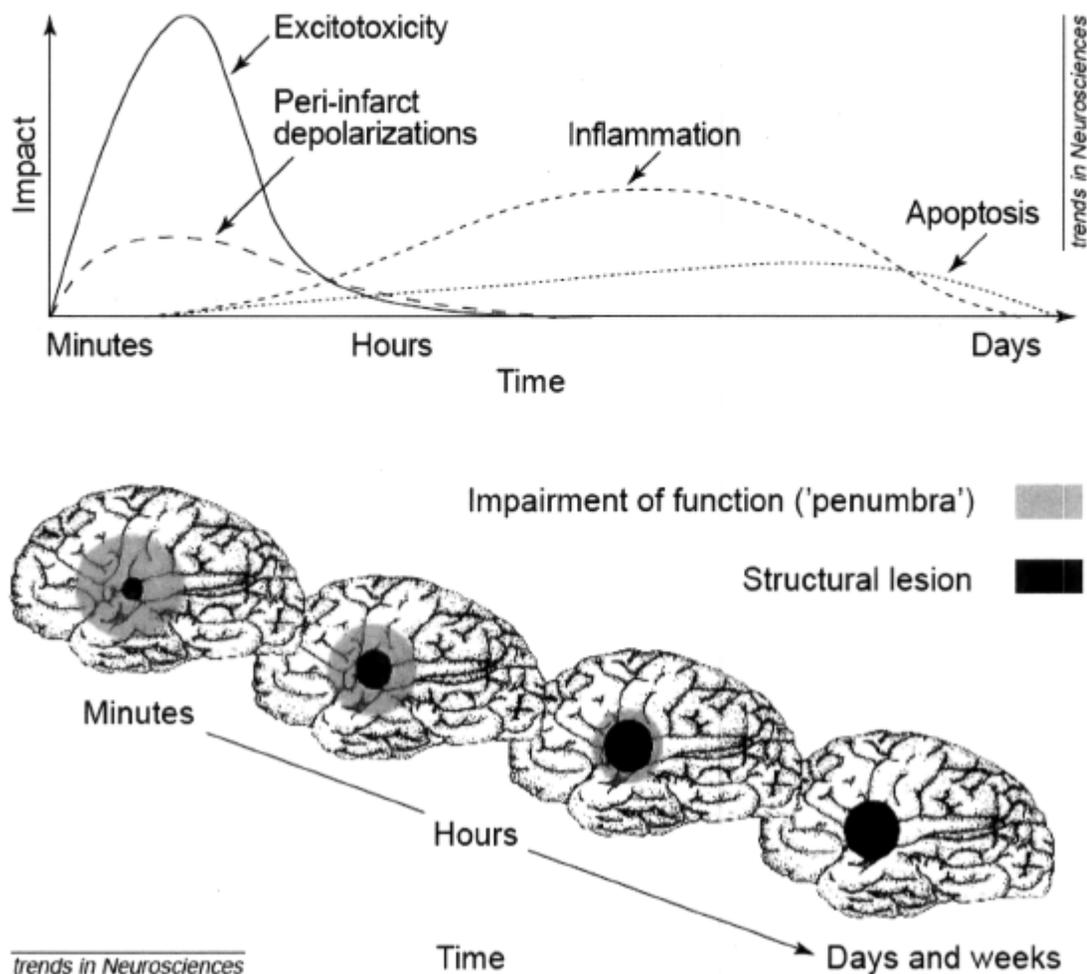


Figure 1. Cascade des événements dommageables et évolution de la région lésée à la suite d'une ischémie cérébrale (Dirnagl, 1998).

Pour fonctionner, le cerveau consomme beaucoup de glucose et d'oxygène. Comparativement au foie, les réserves énergétiques dans le cerveau sont très petites. En effet, la boîte crânienne ne permet pas de variations de volume importantes sans affecter la pression intracrânienne (Brown, 2007). La réduction ou l'arrêt du substrat énergétique se fait donc sentir après quelques minutes seulement et engendre plusieurs événements (figure 2). Cet arrêt en apport sanguin altère l'équilibre énergétique dérégulant le gradient ionique

glutamate dans les fentes synaptiques et dans le milieu extracellulaire. En plus d'être toxique pour les neurones, une concentration élevée en glutamate dans le milieu extracellulaire engendre une entrée de sodium (Na^+) et de chlore (Cl^-) dans les neurones *via* les canaux perméables aux ions monovalents, comme, par exemple, le récepteur-canal AMPA (Dirnagl, 1999). Cette entrée d'ions à l'intérieur des neurones est alors plus importante que l'expulsion de potassium, ce qui crée un appel d'eau par osmose entraînant l'œdème cérébral. L'œdème cérébral augmente la pression intracrânienne, comprime le système vasculaire et cause des hernies cérébrales que l'on nomme engagement. Selon le type d'engagement, différentes complications peuvent apparaître et entraîner le décès du patient (Dirnagl, 1999). Ces phénomènes pathologiques contribuent à l'augmentation du volume de la zone lésée.

Les neurones et les cellules gliales qui ne peuvent pas maintenir leur potentiel de membrane, c'est-à-dire la polarisation électrique de la membrane, vont se dépolariser. La dépolarisation est permanente dans le foyer de la lésion ischémique. Par contre, dans la penombra, les cellules parviennent lentement à rétablir leur potentiel de membrane. La forte concentration de K^+ et de glutamate libérée par les cellules dans le milieu extracellulaire va aussi induire le phénomène de « spreading depression ». C'est-à-dire que des vagues de dépolarisation vont se propager vers les tissus environnants. L'alternance de polarisation-dépolarisation va ainsi épuiser les réserves énergétiques des neurones de la penombra. La « spreading depression » consomme de l'énergie et contribue à augmenter le volume de la lésion ischémique. Des études menées chez les rats ont démontré que l'administration de MK-801, un antagoniste des récepteurs NMDA, un récepteur ionotrope activé par le glutamate, réduit le nombre de dépolarisation et diminue le volume de la zone ischémique. Ce phénomène n'a pas encore été clairement démontré chez l'homme, mais les concentrations extracellulaires élevées en K^+ et en glutamate laissent présager que le phénomène existe (Iijima, 1992).

Le Ca^{2+} est un second messager universel et après une ischémie cérébrale, sa concentration augmente à l'intérieur des neurones. Le Ca^{2+} entre dans les neurones par les canaux NMDA, AMPA, les canaux calciques voltages dépendants, les SOC (store-operated channels) et par les pompes ioniques ATP-dépendantes $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ qui sont dérégulées. Cela

engendre une série d'événements cytoplasmiques qui aura un impact sur les dommages tissulaires cérébraux (voir figure 2). Parmi ceux-ci, il y a entre autres l'activation d'enzymes protéolytiques qui vont dégrader les protéines du cytosquelette et de la matrice extra cellulaire. L'activation de la phospholipase A₂ et de la cyclooxygénase va générer des radicaux libres et surcharger les mécanismes endogènes de récupération (Dirnagl, 1999). Les radicaux libres vont alors attaquer les composantes cellulaires. Ils peuvent détruire l'ADN, dérégler les processus cellulaires et causer des dommages aux membranes cellulaires. Par exemple, les mitochondries sont affectées lorsqu'il se crée des pores dans leur membrane interne, ce qui libère des espèces oxygénées hautement réactives (free oxygen radicals/species), des molécules pro-apoptotiques, le cytochrome C, en plus d'arrêter la production d'ATP (Durukan, 2007).

En conclusion, les organelles lésées comme le réticulum endoplasmique, les mitochondries et les vésicules synaptiques de la cellule libèrent à leur tour dans le milieu du Ca²⁺ ce qui augmente significativement la concentration en Ca²⁺ intracellulaire. Tout ceci entraînera finalement, selon le cas, la mort cellulaire par nécrose ou apoptose (Durukan, 2007).

1.1.1 L'inflammation

Quelques heures (4 à 6) seulement après l'occlusion d'une artère, les cellules immunitaires (leukocytes, macrophages) vont adhérer à la membrane vasculaire, la traverser et s'accumuler dans le cerveau. Une fois situés dans la région ischémique, ils vont exprimer divers facteurs de transcription comme le facteur nucléaire kappa B (NFκB), les facteurs induits par l'hypoxie (HIF) et le facteur de régulation de l'interféron (IRF-1). Ces facteurs de transcription vont stimuler l'expression de médiateurs pro-inflammatoires comme le TNFα et l'interleukine-1 (IL-1β) (Wang, 2006). En plus d'être libéré par les cellules immunitaires, certaines cytokines comme le TNFα et le IL-1β, sont directement libérées par les cellules endommagées (neurones et glies) du cerveau. À la suite d'une ischémie cérébrale, ces deux cytokines ont une expression biphasique et bloquer le récepteur de l'IL-1β diminue le volume de la zone endommagée. Le TNFα aurait à la fois un effet néfaste et un effet bénéfique sur les cellules selon que ce soit le récepteur TNFR1 ou le récepteur TNFR2 qui soit activé (Wang, 2006).

L'intégrité de la barrière hémato-encéphalique est aussi affectée, entre autres par la libération de molécules pro-inflammatoires, mais aussi par le manque d'oxygène, par les radicaux libres et surtout par la destruction de la lame basale par les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) libérées à la suite de l'ischémie cérébrale. Une fois la barrière plus perméable, les cellules immunitaires comme les neutrophiles, suivi des monocytes et des lymphocytes, vont pouvoir pénétrer facilement la région ischémique. Ces cellules ont la capacité de libérer d'autres molécules pro-inflammatoires qui vont venir à leur tour exacerber le processus inflammatoire. Des études ont démontré que l'activité du MMP-9 est fortement augmentée entre 15 et 48 heures après une ischémie focale (Danton, 2003). Chez les patients ayant subi une ischémie cérébrale, il existe d'ailleurs une corrélation positive entre la concentration en MMP et le volume de la lésion ischémique (Danton, 2003). Conséquemment à la libération des molécules pro-inflammatoires, l'expression des molécules d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1), des P-sélectines et E-sélectines, tous des molécules d'adhésions sur la surface des cellules endothéliales, est induite (Figure 3). Ces molécules vont interagir avec leurs récepteurs complémentaires spécifiques à la surface des leucocytes. Les sélectines vont permettre aux leucocytes de rouler le long de l'endothélium ce qui va faciliter un contact plus ferme avec ICAM-1. Tous ces leucocytes adhérents à la paroi endothéliale réduisent le débit sanguin des petits capillaires ce qui nuit à la re-perfusion et prolonge l'hypoxie (Stoll, 1998). Après l'adhésion, la diapédèse peut avoir lieu. La diapédèse est le mécanisme par lequel les cellules immunitaires s'introduisent entre les cellules endothéliales d'un capillaire sanguin en réponse à des signaux chimiques (Stoll, 1998). De la même façon, les monocytes/macrophages pénètrent la barrière hémato-encéphalique et deviendront entre 5 et 7 jours le type cellulaire prédominant dans la zone ischémique (Danton, 2003).

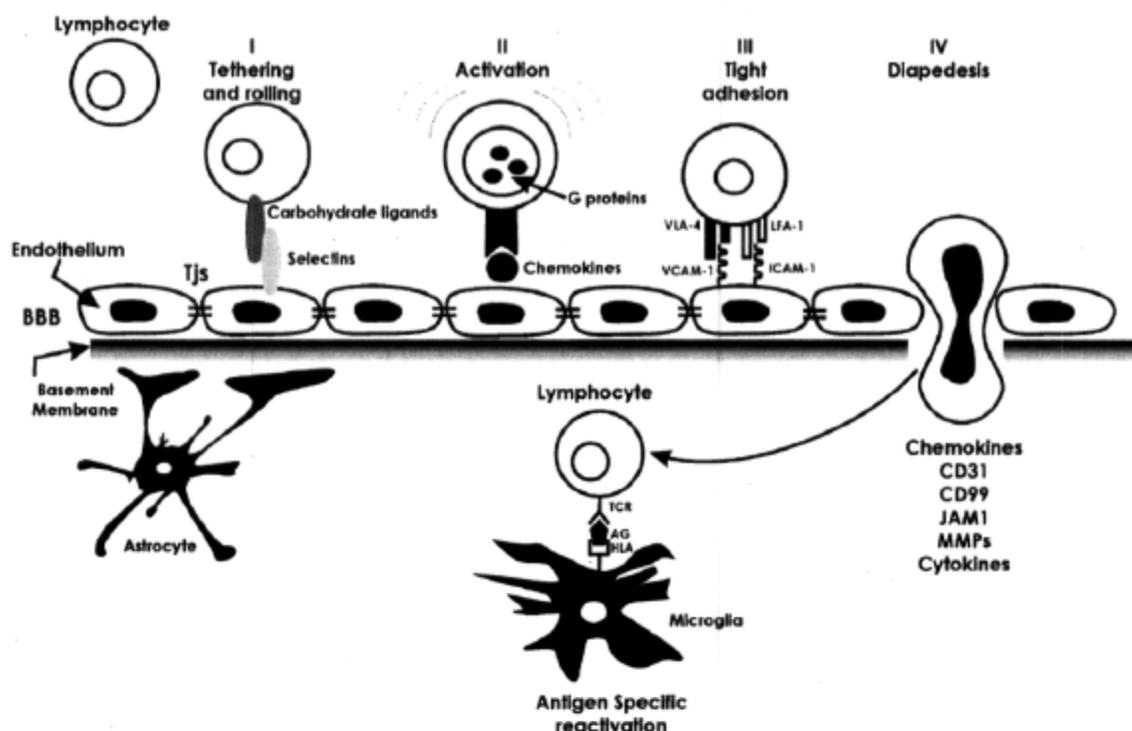


Figure 3. Mécanisme moléculaire résumant la diapédèse (Correale, 2007).

1.2 Les astrocytes

1.2.1 Types et morphologies

Le système nerveux central (SNC) est composé de plusieurs types cellulaires : les neurones, les oligodendrocytes, les microglies et les astrocytes. L'astrocyte est le type cellulaire le plus abondant dans le SNC. Les astrocytes représentent environ 35 % de la masse totale du SNC et le ratio astrocytes/neurones varie selon la région dans le cerveau. En se basant sur la morphologie, les astrocytes sont classés en deux groupes principaux : les astrocytes de type fibreux et les astrocytes de type protoplasmique (Panickar, 2005). Les astrocytes fibreux ont des prolongements plus larges, moins nombreux et plus longs que les astrocytes protoplasmiques. De plus, les astrocytes fibreux ont moins de ramifications qui s'étendent de façon symétrique autour du corps cellulaire (Panickar, 2005). La localisation des deux types d'astrocytes varie dans le cerveau : les astrocytes protoplasmiques se retrouvent dans la matière grise et les astrocytes fibreux se retrouvent en grande partie dans la matière blanche. Les astrocytes occupant la frontière entre la matière blanche et la matière grise et qui projettent dans les deux couches présentent les deux types de morphologie. Les

prolongements d'un astrocyte dans la matière grise sont de types protoplasmiques et les prolongements dans la matière blanche sont de types fibreux. L'environnement extracellulaire influencerait donc la morphologie astrocytaire (Panickar, 2005).

Le cytosquelette des astrocytes matures est constitué en grande majorité de filaments intermédiaires de 8-9 nm de type GFAP (glial fibrillary acidic protein). Cette protéine est l'une des plus synthétisée dans le cerveau et se retrouve en plus grande quantité dans les astrocytes fibreux (Panickar, 2005 et Eng, 2000). La protéine GFAP a un rôle dans la modulation de la motilité cellulaire et dans le maintien de la morphologie de l'astrocyte en assurant la stabilité de ses prolongements (Eng, 2000). Dans les astrocytes fibreux, ces filaments sont exprimés en grande quantité et un marquage immunohistochimique contre la protéine GFAP révèle la forme étoilée de ce type d'astrocyte. Par contre, cette protéine ne représenterait que 15 % du volume total de l'astrocyte (Panickar, 2005).

1.2.2 Les rôles des astrocytes dans le système nerveux central.

Prédire le rôle d'un astrocyte en se basant sur sa morphologie est impossible car les astrocytes ont de multiples fonctions selon leur localisation dans le SNC. Leur grande hétérogénéité fonctionnelle réside dans la diversité des récepteurs membranaires, des canaux ioniques, des neurotransmetteurs recapturés, du contenu enzymatique, de leur habilité à générer différents facteurs de croissance, des neuropeptides exprimés et du couplage des jonctions communicantes. Théoriquement, il pourrait y avoir autant de type d'astrocytes qu'il y a de types de neurones (Panickar, 2005).

Les astrocytes entretiennent des liens étroits avec les neurones. Une étude a démontré que chez le rat, dans une région précise de l'hippocampe (CA1), un seul astrocyte pouvait faire contact avec plus ou moins 140 000 synapses, démontrant l'influence de ce type cellulaire sur l'activité neuronale (Panickar, 2005). En plus de communiquer avec les neurones, les astrocytes sont interconnectés entre eux par des jonctions communicantes « gaps-jonctions ». Les jonctions communicantes sont des pores intercellulaires qui permettent le passage de molécules de petits poids moléculaires et de courant électrique de cellules en cellules. Elles permettent la propagation de vagues calciques, qui est un moyen de

communication entre les astrocytes, mais aussi entre les neurones *via* les astrocytes (Dienel, 2005).

Les astrocytes ont d'autres rôles dans le SNC. Ils sont aussi impliqués dans la régulation de l'environnement extracellulaire, la production et le relâchement de facteurs de croissance, la réponse immunitaire, le support neuronal, la synaptogenèse et la neurogenèse (Panickar, 2005).

1.2.2.1 Régulation de l'environnement extracellulaire

Les astrocytes sont aussi impliqués dans la régulation de l'environnement extracellulaire. Par exemple, les prolongements astrocytaires se retrouvent autour des fentes synaptiques et permettent la recapture des neurotransmetteurs glutamatergiques. Cela est primordial pour optimiser la neurotransmission et éviter l'excitotoxicité. Ce sont les transporteurs EAAT1 (GLAST) et EAAT2 (GLT-1) des transporteurs de glutamate qui permettent de le concentrer dans les astrocytes. Ils sont efficaces, car la concentration en glutamate est de 3 à 10 000 fois plus élevée dans les astrocytes que dans le milieu extracellulaire. Le nombre de ces transporteurs varie d'une région à l'autre dans le cerveau. Par exemple, les transporteurs de types EAAT2 se retrouvent en plus grandes concentrations dans l'hippocampe, alors que le cortex est plus riche en récepteurs de type EAAT1 (Panickar, 2005).

Une autre fonction importante des astrocytes est de tamponner les excès de K^+ relâchés par les neurones lors de la dépolarisation dans le milieu extracellulaire. On retrouve donc des prolongements astrocytaires autour des nœuds de Ranvier, des neurones et des fentes synaptiques. Le contrôle des concentrations ioniques de potassium prévient les dépolarisations subséquentes non désirées. Les astrocytes utilisent les jonctions communicantes pour déplacer le K^+ d'une région concentrée vers des régions moins concentrées (Panickar, 2005).

Les astrocytes sont aussi impliqués dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (Panickar, 2005). Les pieds astrocytaires entourent les vaisseaux sanguins

pour former une gaine limitant les échanges entre le domaine vasculaire et le domaine glial sans toutefois former la barrière. Les astrocytes auraient plutôt un rôle à jouer sur la perméabilité des cellules endothéliales qui forment la barrière hémato-encéphalique (Miller, 1999).

1.2.2.2 Support neuronal

Les astrocytes sont une source énergétique pour les neurones car ils fournissent les substrats nécessaires lors de période de stress énergétique (Panickar, 2005). Le cerveau consomme beaucoup d'énergie et les réserves de glycogène sont minimales comparées à celles retrouvées dans le foie et les muscles. Les quantités de glycogène ne sont pas distribuées uniformément dans le cerveau et il y a deux fois plus de glycogène dans la matière grise (où sont localisés les corps cellulaires de neurones) que dans la matière blanche (où sont localisés les axones des neurones). Cette différence peut expliquer pourquoi certaines régions sont plus susceptibles à l'hypoglycémie (Brown, 2007). Dans le cerveau adulte, le glycogène se retrouve seulement dans les astrocytes. De plus, les astrocytes ont la capacité de métaboliser le glycogène grâce à des enzymes. Lors d'une ischémie cérébrale ou lorsque les demandes en glucose dépassent les réserves en glycogène contenu dans les astrocytes, le glycogène est transformé en lactate, libéré dans le milieu extracellulaire pour être capté par les neurones et utilisé. Le lactate est utilisé, car le glycogène est une grosse molécule qui ne peut pas sortir des cellules. Un composé intermédiaire doit être utilisé. De plus, les astrocytes ne possèdent pas l'enzyme nécessaire, le glucose-6-phosphatase, pour synthétiser du glucose à partir du glycogène (Brown, 2007). Par contre, les astrocytes possèdent le lactate déshydrogénase, qui convertit le pyruvate en lactate. En culture, les neurones et les axones fonctionnent normalement lorsque le lactate est substitué au glucose (Brown, 2007).

1.2.3 Les astrocytes lors de l'ischémie

Une à trois heures après une ischémie cérébrale, les astrocytes démontrent une légère hypertrophie cytoplasmique. Le processus débute par les pieds astrocytaires qui sont autour des capillaires sanguins pour se généraliser à tout l'astrocyte. La cause de l'hypertrophie est probablement multifactorielle. La baisse en apport énergétique lors d'une ischémie

cérébrale nuit au rendement des pompes ioniques ATP-dépendantes. L'arrêt complet et/ou la baisse de rendement énergétique empêchent ainsi le maintien du volume cellulaire au détriment d'une membrane électriquement neutre (Panickar, 2005). En effet, des cultures d'astrocytes privées de glucose provenant de souris transgéniques dont l'échangeur Na^+/H^+ (NHE1) a été génétiquement inactivé, démontrent une réduction marquée du gonflement cellulaire et de la concentration intracellulaire en Na^+ (Panickar, 2005). Cet échangeur aurait donc un rôle important dans le gonflement cellulaire après une ischémie. L'aquaporine-4, une protéine impliquée dans le transport de l'eau, contribuerait aussi au gonflement astrocytaire. De plus, les concentrations élevées de potassium, de glutamate, d'acide lactique, de radicaux libres et d'acide arachidonique augmentent le gonflement astrocytaire lors de l'ischémie. Un gonflement moyen de l'astrocyte a des effets bénéfiques en augmentant la synthèse de glycogène et favorise la libération de taurine, un acide aminé qui diminue l'excitotoxicité, en plus d'avoir des propriétés anti-oxydantes et neuroprotectrices (Panickar, 2005). Des problèmes surviennent lorsque le gonflement astrocytaire devient trop important.

Aux effets négatifs causés par le gonflement cellulaire s'ajoute le relâchement de glutamate et la compression des capillaires (Kimelberg, 1990). Cela aurait comme conséquence de réduire davantage l'apport sanguin, d'altérer les concentrations extracellulaires ioniques et finalement de causer la mort des astrocytes par rupture de la membrane cellulaire (Panickar, 2005).

1.2.4 L'activation des astrocytes lors de l'ischémie.

Suite à l'ischémie cérébrale, des changements cytologiques, histochimiques et biochimiques sont notés chez les astrocytes (Eng, 1992). Ces changements sont le résultat d'une réaction des astrocytes aux cellules endommagées dans le SNC ou parce que les astrocytes sont eux-mêmes endommagés (Panickar, 2005). Une fois activés, les astrocytes peuvent s'hypertrophier, proliférer et/ou se déplacer. L'activation de l'astrocyte entraîne une augmentation du volume du noyau, une augmentation du nombre de mitochondries et des ribosomes et un élargissement de l'appareil de Golgi. Ces changements reflètent une

activation du métabolisme (Panickar, 2005). Grâce à la surexpression de la protéine GFAP les astrocytes sont d'ailleurs facilement identifiables (Eng, 1992).

Cependant, même si l'augmentation de l'expression des filaments de type GFAP est parfois utilisée comme marqueur des dommages neuronaux, la signification et la dynamique de cette réponse demeurent inconnues (Herrmann, 2003).

Une fois activés, les astrocytes vont former une barrière autour de la zone lésée, appelée cicatrice gliale. Le rôle de la cicatrice gliale est indéterminé. Elle représenterait une tentative du SNC pour restaurer l'environnement extracellulaire en contenant la zone endommagée pour favoriser les processus de réparation (Panickar, 2005). Pour déterminer le rôle des filaments intermédiaires après un traumatisme cérébral, une étude a utilisé des souris double knock-out GFAP^{-/-}Vimentine^{-/-} (Vim); la protéine vimentine est un filament intermédiaire dont l'expression est augmentée dans les astrocytes après une ischémie cérébrale (Pekny, 2005). La souris GFAP^{-/-}Vim^{-/-} est donc une souris dont les astrocytes ne possèdent pas de filaments intermédiaires. Après une lésion du cortex faite à l'aide d'une aiguille chez les souris GFAP^{-/-}Vim^{-/-}, la cicatrice gliale est moins bien organisée et plus lâche que chez les souris contrôle. Par contre, il a été démontré que suite à une lésion de la moelle épinière la régénération synaptique chez les souris GFAP^{-/-}Vim^{-/-} serait supérieure à celle observée chez les souris WT (Pekny, 2007). En conclusion, l'astrogliose serait bénéfique dans la phase aiguë en limitant l'étendue de la lésion, mais elle deviendrait néfaste lors de la phase de régénération en nuisant à la régénérescence des neurones (Pekny, 2005).

Par ailleurs, les astrocytes influenceraient aussi la taille de la lésion ischémique grâce aux jonctions communicantes. Deux études différentes, ont bloquées les jonctions communicantes avec de la carbenoxolone ou en réduisant génétiquement la connexine 43, un constituant important des jonctions communicantes. Les études ont respectivement démontré que bloquer les jonctions communicantes limitait et aggravait les dommages ischémiques. En conclusion, l'implication des jonctions communicantes est à la fois bénéfique et néfaste selon le temps écoulé après la lésion, le type de lésion et l'étendue des dommages (Pekny, 2005).

Chez les souris GFAP knockout, le volume des lésions cérébrales est supérieur à celui des souris WT (Pekny, 2005). En effet, le débit cérébral local est plus faible et la pression intracrânienne plus élevée que chez les souris contrôles. De plus, l'absence de la protéine GFAP semble avoir une incidence sur la perte des neurones pyramidaux dans les régions CA1 et CA3 de l'hippocampe. En effet, une plus grande mort de ce type de neurones fut observée suite à une ischémie cérébrale chez les souris GFAP knockout. Par ailleurs, les astrocytes dont la protéine GFAP fut enlevée génétiquement sont incapables de fusionner le transporteur de glutamate GLT-1 à la surface de la cellule (Panickar, 2005). La diminution de ce transporteur à la membrane cellulaire empêcherait les astrocytes de re-capter le glutamate en excès dans le milieu extracellulaire, augmentant ainsi l'excitotoxicité.

Les astrocytes sont aussi plus résistants que les neurones face aux accidents ischémiques. Leur contenu plus élevé en enzymes et en protéines impliquées dans les mécanismes de défense protège les astrocytes lors d'ischémie. Par exemple, les astrocytes présentent des niveaux élevés en protéines antioxydantes et en protéines antiapoptotiques comme le Bcl-2. De plus, les astrocytes ont des réserves énergétiques qui leur permettent de survivre plus longtemps que les neurones en situation de gluco-déprivation. Une activation supérieure de la carboxylase pyruvate de même que la possibilité d'utiliser les acides gras et les corps cétoniques rendent les astrocytes aussi plus résistants à l'ischémie (Panickar, 2005). Par contre, les astrocytes peuvent avoir une fonction différente selon leur contenu cellulaire et leur emplacement, il en va de même pour la résistance lors d'une ischémie (Brown, 2007). Par exemple, les astrocytes localisés dans l'hippocampe seraient plus sensibles que les astrocytes corticaux, ce qui serait en grande partie dû à une différence de leur contenu en antioxydants et en protéines antiapoptotiques (Panickar, 2005).

1.3 Les oestrogènes

Les œstrogènes constituent une famille d'hormones stéroïdes retrouvées chez les femelles et, en plus faible quantité, chez les mâles. Les trois différents types d'oestrogènes naturels sont l'oestradiol (E2), l'oestriol (E3) et l'oestrone (E1). Sécrétée par les ovaires, l'hormone principale féminine, l'oestradiol, est synthétisée à partir de la testostérone par l'aromatase (figure 4) (Bear, 2002). Dans le cerveau, le 17β -estradiol est un facteur de croissance qui

favorise la croissance et la différenciation cellulaire, en plus d'être un facteur trophique (Toran-Allerand, 2004).

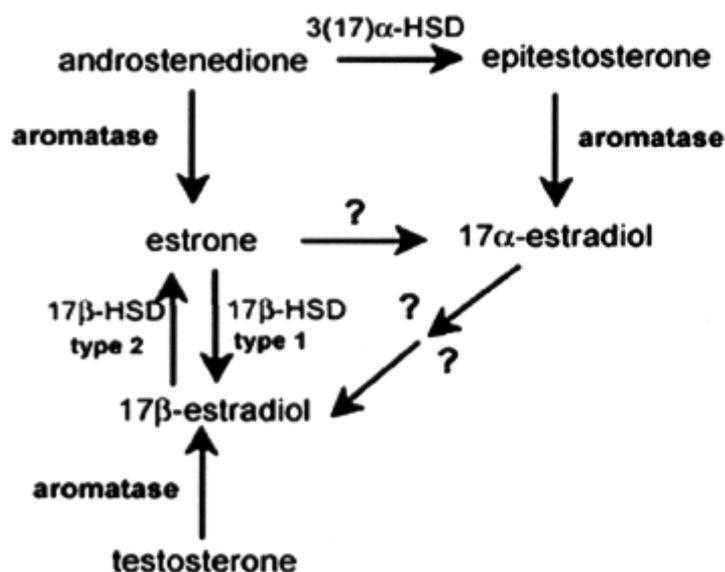


Figure 4. Mécanisme de biosynthèse du 17β-estradiol (Marieb, 1993).

Les récepteurs œstrogéniques se retrouvent partout dans le SNC. Les cellules qui possèdent des récepteurs œstrogéniques sont : les neurones, les astrocytes, les cellules de l'endothélium, les plaquettes sanguines et les microglies. Les oestrogènes ont comme particularité de se lier à des récepteurs intranucléaires ayant donc un effet direct sur la régulation de certains gènes et facteurs de transcription (Toran-Allerand, 2004). Normalement, les mécanismes utilisés par les hormones stéroïdes sont l'activation directe de gènes *via* les récepteurs œstrogéniques intranucléaires (figure 5) ou une activation rapide *via* les récepteurs œstrogéniques membranaires (McCullough, 2003). Lors d'une ischémie cérébrale, les mécanismes employés par les oestrogènes seraient les mêmes.

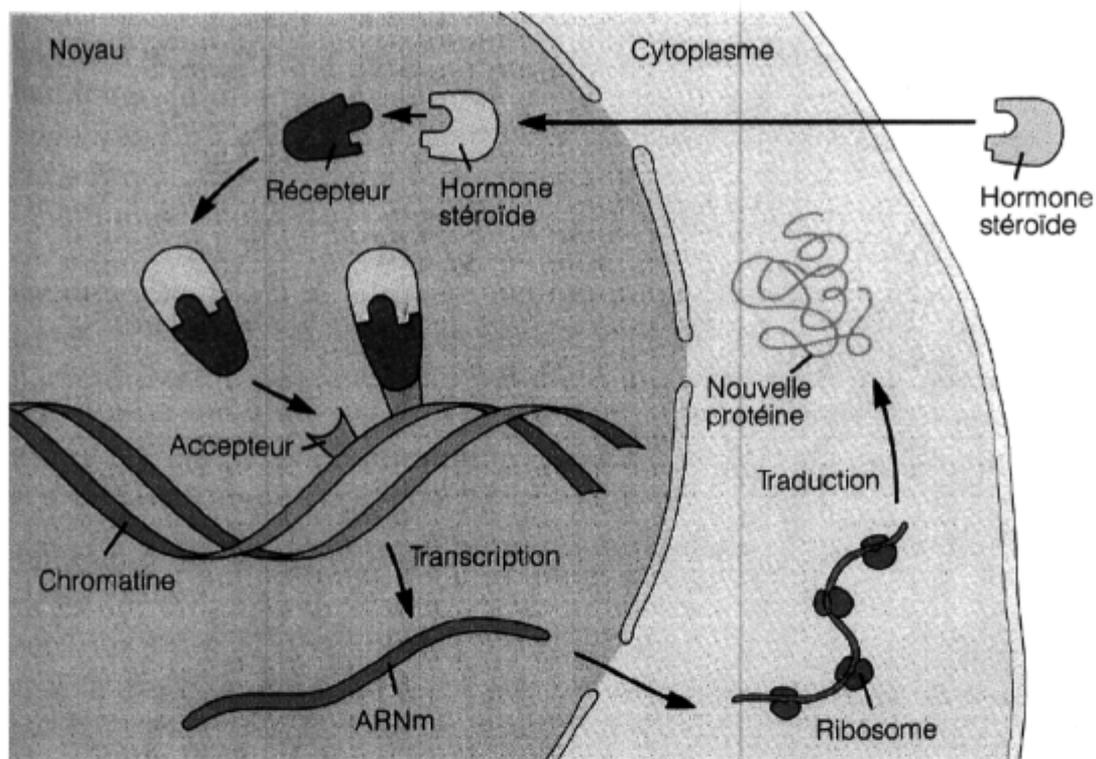


Figure 5. Activation directe d'un gène par une hormone stéroïde (Marieb, 1993).

Avant la ménopause, les risques de subir une ischémie cérébrale sont moindres chez les femmes comparées aux hommes de même âge. Par contre, après la ménopause, qui se caractérise par la chute d'oestrogène et de progestérone circulant, les risques de subir un accident cérébral vasculaire augmentent (Gibson, 2006). Ces hormones semblent donc avoir un effet préventif et protecteur chez les femmes, ce qui est appuyé par les études utilisant des modèles animaux. En effet, l'effet neuroprotecteur observé chez les femelles en réponse à une ischémie cérébrale est perdu après une ovariectomie et retrouvé après l'administration exogène d'oestrogènes. Les mêmes observations sont répertoriées chez les mâles, il y a un effet préventif et neuroprotecteur suite à l'administration d'oestrogènes (Hoffman, 2006).

Lors d'une ischémie cérébrale, les dommages causés aux neurones et aux cellules gliales vont varier selon la région touchée, le type de lésion et les doses hormonales administrées. Par exemple, lorsque des concentrations pharmacologiques d'oestrogènes sont administrées

à des souris avant l'ischémie cérébrale, les effets observés sur le cerveau le sont *via* des mécanismes indépendants des récepteurs œstrogéniques. Un des mécanismes indépendants est la récupération des radicaux libres (Culmsee, 1999). Cependant, l'administration de doses physiologiques d'oestrogènes utilise les récepteurs oestrogéniques pour moduler l'expression génique et ainsi favoriser la plasticité synaptique, l'expression de neurotrophines et la production de facteurs favorisant la survie cellulaire (Dubal, 2001).

1.3.1 Le rôle des oestrogènes dans l'ischémie cérébrale

Trois types de récepteurs œstrogéniques ont été identifiés dans le SNC, les récepteurs α (ER α), les récepteurs β (ER β) et les récepteurs X (ER-X). Le récepteur ER α est le récepteur le plus activé suite à une ischémie cérébrale dans le cerveau tandis que le récepteur ER β a un rôle qui n'a pas encore été clarifié. Le récepteur ER β aurait des effets modulateurs, inhibiteurs ou réciproques au récepteur ER α (Toran-Allerand, 2004). Ces deux récepteurs ont par contre le même mode de fonctionnement. Les deux récepteurs sont activés par leurs ligands pour induire la régulation d'une variété de facteurs de transcriptions et de gènes (Figure 5).

En absence d'hormone, les récepteurs ER α et ER β sont sous une forme inactive et forment un complexe avec différentes molécules chaperonnes, dont la protéine de choc thermique 90 (hsp 90). Advenant une liaison entre le ligand et le récepteur, le récepteur et le hsp 90 se phosphorylent et se dissocient. Ce changement de conformation induit alors une interaction avec les séquences d'ADN à l'intérieur d'une région du promoteur spécifique du gène cible. Cette région se nomme éléments de réponse aux oestrogènes (ERE) et régule plusieurs gènes et facteurs de transcription qui après une ischémie cérébrale peuvent induire la libération de facteurs de croissance transformants β (TGF- β) (Toran-Allerand, 2004). Ce mécanisme de fonctionnement est plutôt lent. Les changements rapides engendrés par les oestrogènes, observés après seulement quelques secondes ou quelques minutes, ne peuvent donc pas employer les régions du ERE. Ces modifications sont possibles grâce au troisième récepteur ER-X, situé sur la membrane plasmique. C'est *via* la voie des MAPK, PI3 kinase et Akt que ce type de récepteur est impliqué lors du développement neuronal, mais aussi

dans la neuroprotection suite à une ischémie cérébrale. Il a d'ailleurs été démontré que, 24 heures après une ischémie cérébrale transitoire de l'artère cérébrale moyenne, l'expression des récepteurs ER- α et ER-X est augmentée du côté lésé par rapport au côté non lésé à des niveaux comparables à ceux mesurés lors du développement (Toran-Allerand, 2004). Ceci suggère que les mécanismes ayant lieu lors du développement sont réinitialisés à la suite de traumatismes chez l'adulte.

Les récepteurs œstrogéniques jouent un rôle protecteur lors de l'ischémie cérébrale, car en bloquant les récepteurs ER β et ER α à l'aide d'un inhibiteur, le volume de la lésion cérébrale est plus important (Sawada, 2000). Pour déterminer lequel de ces récepteurs est le plus important lors de l'ischémie cérébrale, une étude a utilisé des souris KO pour le récepteur ER α (ER α KO). Une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne de deux heures a été réalisée sur des souris ER α KO et sur des souris contrôles. Les auteurs ont démontré que le volume de la lésion ischémique sous-corticale n'est pas significativement différent entre les deux groupes de souris. Par contre, les lésions corticales semblent être plus petites chez les souris ER α KO que chez les souris contrôles. Les auteurs concluent que les récepteurs de type α ne sont pas impliqués dans les mécanismes protégeant le cerveau suite à une ischémie cérébrale (Sampei, 2000). Plus tard, une seconde étude a démontré que le récepteur α et non le β confère la protection du cerveau après une ischémie cérébrale (Dubal, 2001). Cependant, cette étude affirme que l'hippocampe est une région où la protection par l'oestradiol n'a aucun effet. En analysant de plus près les deux études, il semblerait que les différences observées dans les résultats soient dues aux conditions expérimentales. En effet, dans la seconde étude, le type d'ischémie utilisée est une occlusion permanente. De plus, les souris furent ovariectomisées et des capsules silastiques d'oestrogène furent implantées de façon sous-cutanée. En effectuant ce contrôle, les chercheurs s'assurent que le taux d'oestrogène libéré dans le sang demeure constant dans les deux groupes de souris. Lors de la première étude, les souris ER α KO et contrôles ne furent pas ovariectomisées, malgré le fait qu'une étude préliminaire avait préalablement démontré que les niveaux endogènes d'oestradiol dans le sérum des souris ER α KO étaient différents des concentrations retrouvées chez les souris contrôles (Couse, 1995). En effet, chez les souris ER α KO, on peut observer des concentrations d'oestradiol sanguin de 10 à

15 fois supérieures à celles retrouvées chez les souris contrôles (Dubal, 2001). Cette concentration anormalement élevée rend alors toute comparaison difficile à interpréter. Avec des concentrations aussi élevées d'œstrogène, les effets observés sont attribuables à des mécanismes indépendants des récepteurs œstrogéniques (Dubal, 2001).

1.3.2 Les oestrogènes, leur effet sur les astrocytes

Dans des conditions normales, les neurones expriment l'aromatase, une enzyme de la super famille du cytochrome p450 qui catalyse la testostérone en oestradiol. Par contre, après une lésion au cerveau, les astrocytes vont commencer à exprimer cette enzyme. L'œstrogène produit et libéré par les astrocytes pourrait donc affecter la régénération des neurones et augmenter le débit sanguin local, réduisant du même coup la mort neuronale (Garcia-Ovejero, 2005).

Les oestrogènes produits par les gonades peuvent aussi moduler la réponse gliale suite à une ischémie cérébrale, à l'aide notamment du ERE qui a été détectée dans la région 5' en amont du promoteur de la protéine GFAP chez l'humain et chez le rat (Laping, 1994). Dans une étude *in vitro*, les auteurs ont démontré que les astrocytes aident à la neurogenèse en sécrétant des facteurs de croissance (Rozovsky, 2002). Un des facteurs de croissance libérés par les astrocytes est le TGF- β (Dhandapani, 2005).

Les oestrogènes produits par les ovaires influencent aussi la morphologie des astrocytes en inhibant la production de la protéine GFAP à la suite de dommages cérébraux (Martinez, 2007). En effet, une étude a comparé l'expression de la protéine GFAP chez des rattes ovariectomisées (ovx) à la suite d'une lésion cérébrale induite à l'aide d'une immunotoxine. Trente jours après la lésion, des capsules contenant de l'oestrogène ou un placebo furent implantés dans l'animal. À la fin du traitement, les animaux ovx traités avec le placebo exprimaient davantage la protéine GFAP que les animaux ovx traités avec l'E₂ (Martinez, 2007). Une seconde étude utilisant un modèle *in vitro* (wounding-in-a-dish) démontra que l'oestradiol augmente la croissance neuronale et réprime la protéine GFAP. Cette baisse en protéines GFAP modifie la réorganisation de la laminine, ce qui augmente la production de matrice extracellulaire fibrillaire qui va supporter la croissance neuronale. Par contre, une étude qui a utilisé des cocultures de neurones et d'astrocytes a démontré que

selon l'endroit d'où provient les astrocytes dans le cerveau, les stéroïdes sexuels ont un effet opposé, allant de l'induction à la répression de la protéine GFAP (Rozovsky, 2002).

1.4 Les traitements hormonaux

En plus d'avoir des effets sur les différents types cellulaires et un effet potentiellement vasodilatateur sur le réseau vasculaire, les oestrogènes ont un effet global sur le cerveau. En effet, les oestrogènes possèdent des propriétés antioxydantes qui agissent comme agent neuroprotecteur lors de l'ischémie cérébrale. Lors d'études réalisées sur des cultures corticales murines, l'administration d'oestrogènes protège les cellules corticales même lorsque l'on injecte au même moment des antagonistes contre les récepteurs des oestrogènes et des inhibiteurs de la synthèse protéique (McCullough, 2003). Cela suggère un effet neuroprotecteur indépendant des voies de signalisation utilisées par les récepteurs oestrogéniques et de la synthèse de nouvelles protéines.

Le moment où l'on administre les oestrogènes après une ovariectomie semble lui aussi être crucial pour obtenir des effets neuroprotecteurs, car après une période d'hypoestrogénicité prolongée, l'administration d'oestrogènes n'offre aucune protection. Cette découverte récente apporterait des explications aux études parfois contradictoires effectuées sur les oestrogènes avec des groupes de femmes et de souris ayant subi une ischémie cérébrale. Elle pourrait expliquer pourquoi plusieurs études ne rapportaient aucun effet préventif de la thérapie œstrogénique sur la fréquence des ischémies cérébrales chez les femmes et les souris ménopausées. Une période prolongée en hypoestrogénicité empêcherait l'effet neuroprotecteur et anti-inflammatoire des oestrogènes d'agir (Suzuki, 2007). Les auteurs ont démontré que suite à une ischémie cérébrale sur des souris ayant subi une période d'hypoestrogénie prolongée, le récepteur ER α n'est plus exprimé. Par contre, les souris qui ont reçu immédiatement de l'oestrogène après l'ovariectomie ont une augmentation de 300 à 450 % du nombre de récepteurs ER α suite à une ischémie cérébrale. Le récepteur ER α , une fois activé par le 17 β -oestradiol, diminuerait l'expression de gènes pro-apoptotiques (Suzuki, 2007). De plus, une administration de E2 protégerait directement le cerveau, diminuerait la surexpression de cytokines pro-inflammatoires comme le MCP-1 et de IL-6

induits par l'ischémie. Le MCP-1 est un chemoattracteur jouant un rôle nocif suite à une ischémie cérébrale. Il augmente l'infiltration des cellules immunitaires provenant de la circulation (monocytes et neutrophiles) vers la zone lésée du cerveau. Après une période prolongée en hypoestrogénicité, la suppression du MCP-1 et de l'IL-6 n'est pas observée (Suzuki, 2007).

1.5 Techniques utilisées

1.5.1 Le cycle oestral chez la souris

Le cycle oestral de la souris, modulé par le système endocrinien, affecte le comportement de la souris ainsi que sa physiologie. Le cycle œstral dure en moyenne de 4 à 6 jours, et ce, durant toute la période de reproduction de la souris. Dans une étude où les chercheurs ont analysé 1000 cycles, dans 36 % des cas le cycle s'étalait sur plus de 4 à 6 jours, pouvant même parfois durer entre 10 et 28 jours. De plus, d'une lignée de souris à l'autre, la durée du cycle peut grandement varier. La durée du cycle est facilement modifiée par des facteurs génétiques, la diète et les pheromones libérées par les compagnons de cage (Pritchett, 2007). Le cycle oestral est divisé en trois phases : une phase anabolique, une phase catabolique et une phase de quiescence. La phase anabolique culmine par la libération des ovocytes et est caractérisée par la croissance cellulaire dans le canal reproducteur. La phase catabolique est observée lorsque les tissus sont en dégénérescence et la phase de quiescence se reconnaît par son absence de changement dans le canal reproducteur (Pritchett, 2007). Le cycle oestral est aussi divisé en 4, 5 ou voir même 13 stades. Dans notre étude nous avons utilisé 4 stades pour cycler nos souris, à l'aide de la technique du frottis vaginal (voir annexe 1).

1-Proestrus. Ce stade amorce la phase anabolique du cycle oestral, caractérisée par le développement des follicules et l'augmentation de la concentration en oestrogènes circulant. Les concentrations élevées en oestrogènes vont stimuler la division cellulaire dans l'utérus et dans le vagin. C'est durant ce stade que les concentrations d'oestrogènes seront les plus élevées. Dans le frottis vaginal, on retrouve beaucoup de cellules épithéliales polynucléées ainsi que quelques leucocytes (Pritchett, 2007).

2-Oestrus. Durant ce stade, les niveaux d'oestrogènes sont élevés et l'ovulation a lieu. La croissance et l'accumulation de fluide dans l'oviducte et l'utérus se poursuivent. L'épithélium vaginal atteint son épaisseur maximale et les cellules de types cornifiées commencent à se détacher de la paroi. C'est la fin de la phase anabolique (Pritchett, 2007).

3-Metoestrus. Après l'ovulation, les concentrations en oestrogènes diminuent. Ce stade est le début de la phase catabolique. La croissance de l'utérus est stoppée et l'épithélium dégénère. Des feuillets entiers de la paroi vaginale s'effondrent et s'agglomèrent, ce qui rend l'observation du frottis au microscope typique. Avec le stade qui évolue, le nombre de leucocytes présents dans le frottis vaginal augmente (Pritchett, 2007).

4-Dioestrus. Le dioestrus est la phase quiescente du cycle oestral. Les concentrations en oestrogènes sont basses et advenant l'absence de fertilisation la concentration en progestérone baisse aussi. À l'analyse microscopique du frottis vaginal, on peut observer des cellules épithéliales ainsi que des leucocytes en grandes quantités (Pritchett, 2007).

1.5.2 Technique d'imagerie *in vivo* utilisée

L'appareil utilisé mesure les photons émis par l'organisme transgénique grâce à une caméra CCD ultra-sensible (capteur à charges défilantes). Le rôle de la caméra CCD est de convertir le signal lumineux en signal électrique et grâce à un programme informatique, il est possible de quantifier l'émission photonique d'une région d'intérêt.

1.5.2.1 La bioluminescence

Il ne faut pas confondre bioluminescence et fluorescence. La fluorescence est la capacité que possèdent certains corps pour émettre des photons de longueurs d'onde plus longues que la longueur d'onde du photon absorbé. La différence entre la longueur d'onde absorbée et émise se traduit en chaleur. La bioluminescence est la production et l'émission de lumière par un organisme vivant *via* une réaction chimique qui transforme l'énergie chimique en énergie lumineuse. Parce que la lumière est produite par les souris, le bruit de fond est quasi inexistant ce qui est un avantage par rapport à la fluorescence. La réaction de bioluminescence nécessite de l'oxygène et de l'ATP pour avoir lieu. C'est pourquoi pour utiliser cette technique les animaux doivent être vivants.

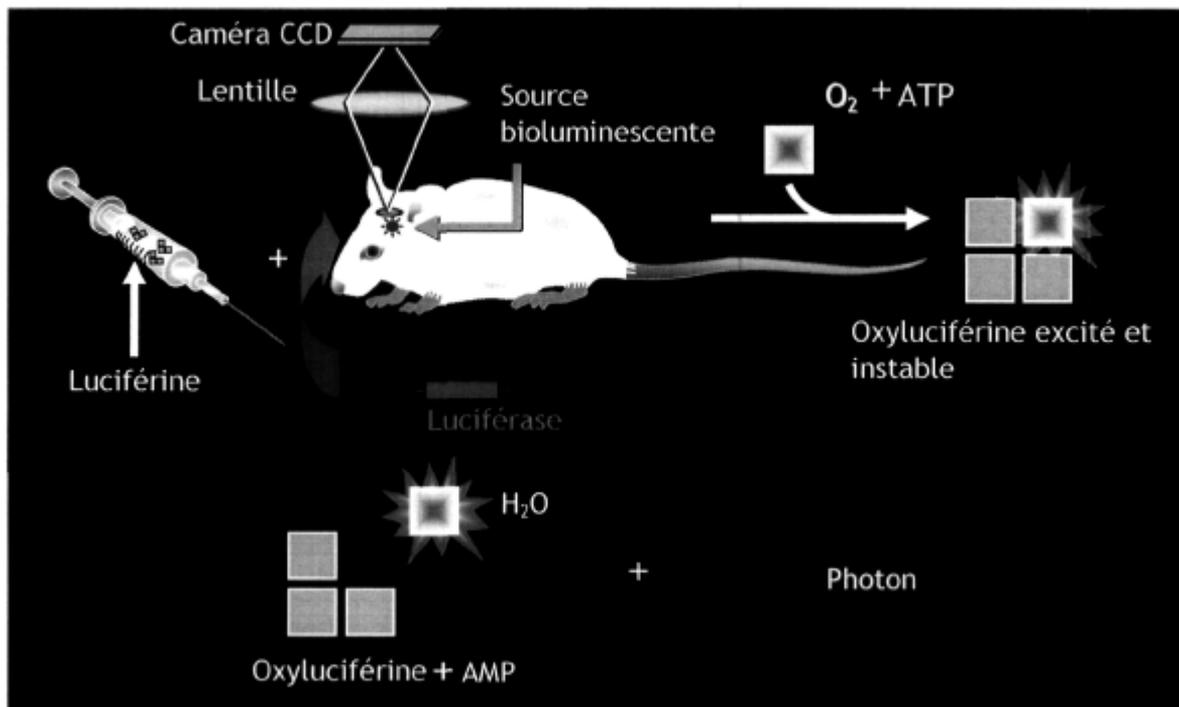


Figure 6. Conversion de l'énergie chimique en énergie lumineuse.

Le gène le plus utilisé en bioluminescence est le gène venant de la luciole *Photinus Pyralis* et les photons captés par la caméra CCD doivent passer au travers de plusieurs couches de tissus selon la règle suivante à une profondeur fixe quelconque, la lumière diffuse dans les tissus autour de la source lumineuse. On peut ainsi affirmer que la brillance de la source lumineuse est directement proportionnelle à la radiance à la surface de l'animal (Xenogen, 2004). Dans sa conformation originale, l'enzyme produit une lumière à large spectre culminant à 560 nm et une fraction significative est émise au-dessus de 600 nm (Contag, 2002). Cette fraction est non négligeable, car pour être captée par la caméra CCD, la lumière émise doit traverser les tissus et l'hémoglobine est la molécule qui absorbe le plus la lumière. Les longueurs d'onde les plus absorbées sont celles en-dessous de 600 nm, donc le bleu et le vert. La fraction émise au-dessus de 600 nm devient disponible aux analyses. Pour rendre la technique encore plus efficace, de nombreuses modifications ont été faites à l'enzyme de la luciole ce qui a permis de déplacer son spectre d'émission vers le rouge (Contag, 2002).

Dans notre étude, la bioluminescence fut utilisée comme technique de visualisation *in vivo*. Cette technique fut mise au point et préconisée, car elle permet de suivre de façon non invasive des processus biologiques en temps réel dans les petits animaux de laboratoire. Voici rapidement les détails de la réaction chimique. L'ATP va se lier avec la luciférine après avoir été lié avec un ion magnésium. Le complexe Mg-ATP va alors servir de support pour la luciférase. Par la suite, ce complexe va réagir avec l'enzyme, la luciférase, et créer une forme intermédiaire, la luciférine adénylate, ce qui entraîne la libération de pyrophosphate. Ce nouveau complexe va alors réagir avec l'oxygène, donnant l'oxyluciférine, un peroxyde qui va rapidement se cycliser après une libération d'AMP. L'oxyluciférine qui est alors dans un état excité va retourner à l'état stable en libérant un photon et du CO^2 (Contag, 2002). Il y a ensuite libération de l'enzyme qui peut alors catalyser une autre réaction. Les photons émis seront alors captés par la caméra CCD et seront transformés en signaux électriques pour les analyses ultérieures. Cette image créée en couleurs fictives sera superposée à une image prise à l'aide d'une caméra normal, en noir et blanc, pour localiser le signal sur la souris.

1.5.2.2 La reconstruction 3D

Le programme informatique utilise la lumière mesurée à la surface de la souris pour générer une reconstruction 3D de la provenance de la source lumineuse. Pour ce faire, le programme informatique a besoin de trois types d'images pour effectuer la reconstruction 3D. Il a besoin d'une photographie de la souris en noir et blanc, d'une image faite avec la lumière structurée et des images bioluminescentes prises entre 560-660nm. Pour le deuxième type d'image, l'appareil illumine le spécimen avec une lumière structurée. La lumière dite structurée consiste à projeter sur le sujet des lignes parallèles à l'aide de lasers. Le déplacement, ou autrement dit les courbures de la lumière sur le corps de la souris, va aider à recréer la topographie du sujet. Le déplacement est la différence entre le lieu où la lumière devrait tomber sur le plateau en absence de l'objet et où la lumière est sur l'image à cause de l'objet. La topographie du sujet est nécessaire pour modéliser le transport photonique à la frontière de l'interface air-tissus. Pour ce qui est des différentes longueurs d'onde, elles sont utilisées, car dans cette plage de longueur d'onde les propriétés optiques des tissus de la souris sont très contrastantes. Grâce à ce phénomène, le programme

informatique est en mesure de calculer la profondeur ainsi que l'intensité de la source lumineuse en fonction de paramètre connu comme la diffusion et la propagation de la lumière dans les tissus (Xenogen, 2004).

1.6 Objectifs du projet et hypothèses de travail

Suite à une ischémie cérébrale, l'activation des astrocytes est impliquée dans la réponse cellulaire inflammatoire. Le passage de la forme quiescente à la forme activée des astrocytes est associé à l'augmentation marquée de l'expression des filaments intermédiaires de type GFAP. Des études utilisent la protéine GFAP comme marqueur indirect des dommages neuronaux sans toutefois connaître l'implication réelle des astrocytes dans le processus inflammatoire suite à une ischémie cérébrale.

C'est pourquoi ce projet a pour objectif général de clarifier la dynamique et le rôle de l'activation des astrocytes suite à une ischémie cérébrale en développant un modèle murin valide et fidèle pour étudier de façon longitudinale la réponse inflammatoire *in vivo*.

Afin d'atteindre l'objectif général, celui-ci fût scindé en objectifs plus spécifiques :

1-Vérifier que suite à une ischémie transitoire de l'artère cérébrale moyenne, l'activation des astrocytes est l'un des éléments de la réponse cellulaire inflammatoire.

2-Démontrer que l'augmentation des dommages neuronaux entraîne une expression proportionnelle de la protéine GFAP.

3-Évaluer le rôle protecteur des oestrogènes dans ce modèle d'ischémie.

4-Étudier l'implication des hormones stéroïdes en effectuant un remplacement hormonal chez les souris GFAP-Fluc ovariectomisées.

Hypothèses émises pour les objectifs :

1-Une forte activité de promoteur de la GFAP devrait être observée du côté ipsilatéral à la lésion chez les souris GFAP-Fluc après une ischémie cérébrale.

2-Une corrélation devrait exister, chez les souris GFAP-Fluc, entre le volume de la lésion ischémique et le niveau d'activation de la GFAP suite à une ischémie cérébrale.

3-Parce que le ERE est retrouvé dans le promoteur de la protéine GFAP, l'oestrogène aurait un rôle important sur la modulation de la réponse des astrocytes suite à une ischémie cérébrale.

4-Une activation du promoteur de la protéine GFAP de même intensité devraient être observée entre les souris ovariectomisées avec les capsules scilastiques et les souris femelles contrôles GFAP-Fluc après une ischémie cérébrale.

Chapitre 2

IMAGERIE IN VIVO DE LA RÉPONSE NEUROINFLAMMATOIRE : LA RÉPONSE ASTROCYTAIRE SUITE À UNE ISCHÉMIE CÉRÉBRALE.

2.1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

OBJECTIF : Développer un modèle murin pour effectuer des analyses longitudinales de la réaction astrocytaire du cerveau après une ischémie cérébrale.

MÉTHODES : Pour mesurer la réponse astrocytaire *in vivo*, nous avons créé un modèle murin exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle transcriptionnel du promoteur de la GFAP murin. La bioluminescence émise chez ces animaux fut captée par la caméra CCD pour être ensuite analysée.

RÉSULTATS : L'analyse de l'émission photonique émise du cerveau des souris GFAP-Fluc révèle une différence marquée de genre en ce qui concerne la réponse des astrocytes après l'ischémie cérébrale. La hausse du signal GFAP est significativement plus élevée chez les souris femelles GFAP-Fluc en metestrus/diestrus que chez les mâles ($1.71 \times 10^7 \pm 0.19 \times 10^7$ vs $0.92 \times 10^7 \pm 0.15 \times 10^7$ *** $p < 0.001$). Les immunohistochimies quantitatives corroborent ces résultats (mâles vs femelles : 13.4 ± 0.5 vs 16.96 ± 0.64 *** $p < 0.0001$). Il est

aussi important de souligner que l'activation astrocytaire/le signal GFAP est modifié par les variations cycliques du cycle oestral en réponse à l'ischémie cérébrale. De plus, lorsque l'on administre des doses pharmacologiques d'oestrogènes aux souris ou lorsque l'on atteint des doses physiologiques élevées, cela atténue la surexpression de la GFAP après l'ischémie cérébrale. Contrairement à la corrélation positive entre l'intensité du signal de la GFAP et le volume de la lésion ischémique chez les souris mâle GFAP-Fluc, aucune corrélation ne fut observée dans tous les groupes de souris femelles GFAP-Fluc.

CONCLUSIONS : Nos résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression des filaments intermédiaires de type GFAP après une ischémie cérébrale pourrait avoir un rôle fonctionnel différent selon le genre et ils ne reflèteraient pas directement l'étendue des dommages neuronaux chez les souris GFAP-Fluc femelles. À l'aide de nouvelles technologies utilisant l'imagerie *in vivo*, nous avons démontré que la réponse inflammatoire engendrée par l'ischémie cérébrale serait associée à des biomarqueurs spécifiques contre les dommages neuronaux selon le sexe de l'animal.

2.2 TITRE

Live imaging of neuroinflammation reveals gender and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury.

Running title: Live imaging of neuroinflammation in stroke

2.3 AUTEURS

Pierre Cordeau Jr. BSc, Mélanie Lalancette-Hébert MS, Yuan Cheng Weng MS, and Jasna Kriz, MD, PhD

2.4 ABSTRACT

Objective : To develop model-system for live analysis of brain inflammatory response in ischemic injury.

Methods: Using a reporter mouse expressing luciferase gene under the transcriptional control of murine GFAP promoter (GFAP-luc mice) and biophotonic/bioluminescent

imaging as tools, we developed a model-system for *in vivo* analysis of astrocyte activation/response in cerebral ischemia.

Results: The analysis of photon emissions from the brains of living animals revealed marked gender differences in astrocyte response to ischemic injury. The increase in GFAP signals was significantly higher in female mice in metestrus/diestrus period as compared to male transgenic mice ($1.71 \times 10^7 \pm 0.19 \times 10^7$ vs $0.92 \times 10^7 \pm 0.15 \times 10^7$ *** $p < 0.001$). Similar results were obtained by quantitative immunohistochemistry (males vs females : 13.4 ± 0.5 vs 16.96 ± 0.64 *** $p < 0.0001$). However, astrocyte activation/GFAP signals showed cyclic, estrus-dependent variations in response to ischemic injury. Physiologically higher levels of estrogen and application of pharmacological doses of estrogen during replacement therapy attenuated GFAP up-regulation after stroke. Interestingly, contrary to positive correlation between the intensities of GFAP signals and the size of the infarction in male mice, no correlation was observed in any of the experimental group in female GFAP-luc mice.

Interpretation: Our results suggest that GFAP up-regulation in ischemic injury may have different functional significance in female and male experimental animals and may not directly reflect the extent of ischemia-induced neuronal damage in female GFAP-luc mice. Using novel live imaging approach, we demonstrated that early-phase brain inflammatory response to ischemia may be associated with gender-specific biomarkers of brain damage.

2.5 INTRODUCTION

Reactive astrogliosis is one of the key components of the cellular responses to brain injuries and the passage from the quiescent to reactive astrocytes is associated with strong up-regulation of the intermediate filament, glial fibrillary acidic protein (GFAP)(1-3). Increase in GFAP expression has been a hallmark of many neurodegenerative conditions such as Parkinson's, Alzheimer's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis (4-7). In cerebral ischemia, GFAP has been widely used as an alternative marker of neuronal damage (8-10).

Recent studies employing GFAP knockout mouse suggested that the role of this intermediate filament protein in brain injuries may be more complex than previously thought (11). Contrary to expectations, absence of GFAP protein has been associated with

increased susceptibility for ischemic brain damage following middle cerebral artery occlusion (MCAO) and the marked alterations in post-traumatic glial scarring and tissue healing (12,13). In cerebral ischemia, intensively stained GFAP-positive astrocytes accumulate in large numbers in the areas around ischemic lesion. The functional significance of such astrocytic response surrounding focal cerebral infarcts is still unclear (14,15). To further investigate the role of astrocyte response to ischemia, we took the advantage of GFAP-luc transgenic mice (16). In this mouse model the luciferase gene (Firefly Luciferase-luc) is driven by the GFAP promoter and luciferase expression (bioluminescence photon emission) can be followed longitudinally in live animals using biophotonic imaging and high resolution Charged Coupled Device (CCD) camera (16, 17).

We report here a marked gender difference in astrocyte response to ischemic injury. Further our results suggest that functional significance of post-ischemic GFAP up-regulation may differ in female and male mice.

2.6 MATERIAL AND METHODS

Transgenic mice

The transgenic GFAP-luc mice (FVB/N background and heterozygous for Luc gene) were obtained from Xenogen (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). In this mouse model, luciferase reporter (Firefly luciferase) is driven under the transcriptional control of the 12 kb fragment of murine GFAP promoter.¹⁶ The GFAP-luc transgenic mice were genotyped by PCR with HotStar Taq Master mix Kit (Quiagen, Mississauga, ON, Canada) in 15 mM MgCl₂ PCR buffer with the following primers: 5'GAAATGTCGGTTCGGTTGGCAGAAGC and 5' CCAAACCGTGATGGAATGGAACAACA. The PCR conditions were as follows: 95 °C -15 min, 30 cycles (94 °C -30 secs, 65 °C -30 secs, 72 °C -1 min. 72 °C -7 min.). All experimental procedures were approved by the Laval University animal care ethics committee and are in accordance with The Guide to the Care and Use of Experimental Animals of the Canadian Council on Animal Care.

Surgical procedures

As previously described the transient focal cerebral ischemia was induced by unilateral left middle cerebral artery occlusion (MCAO) (18,19). The surgery was carried out on 2-3 months old male and female GFAP-luc mice and their wild-type (FVB/N) littermates. Unilateral transient focal cerebral ischemia was induced by intraluminal filament occlusion of the left MCA with the 6-0 silicon-coated monofilament suture during 1 hour followed by reperfusion time of 24 and 72 hours, 5 and 7 days after surgery. To avoid cooling, the body temperature was maintained at 37°C with a heating pad. All animals were allowed free access to water and food before and after surgery.

Ovariectomy (OVX) was performed on anaesthetized female mice at 10 weeks of age by bilateral removal of ovaries. The MCAO was induced 14 and 40 days following OVX. To investigate the effects of estrogen replacement therapy, as previously described 20 one group of OVX mice was anesthetized and were implanted (subcutaneously) with a silastic implant of cholestrerol to 17 β E2 100:1. The other group was SHAM operated. Seven days after surgery the mice were subjected to MCAO and imaged at different time-points after experimental ischemia.

Vaginal smears and hormone detection

Vaginal epithelial cells were obtained from female mice, smeared onto precleaned slides. Slides were then evaluated for presence of white blood cells and for morphology of epithelial cells to determine the stage of estrus cycle. Estradiol (pg/ml) was determined from frozen serum and run in duplicate using Gas Chromatography Mass spectrometry (GCMS). The estradiol levels were non detectable in OVX mice vs. 119.03 pg/ml in OVX mice on estrogen therapy (Lower Limit of Quantitation LLOQ: 2-3 pg/ml).

In vivo bioluminescence imaging

The images were gathered using IVIS 200 Imaging System (Xenogen, Alameda, CA, USA). Prior to imaging session, the mice received intraperitoneal (i.p.) injection of D-luciferine, a luciferase substrate (150 mg/kg, Xenogen, Alameda, CA, USA) dissolved in 0.9 % saline. The mice were then anesthetized with 2 % isoflurane in 100 % oxygen at a

flow rate of 2 L/min and placed in the heated, light-tight imaging chamber. Images were collected using high sensitivity CCD camera with wavelengths ranging from 300-600 nm. Exposition time for imaging was 1-2 minutes using different field of views and f/1 lens aperture. As previously described bioluminescence emission was normalized and displayed in physical units of surface radiance, photons per second per centimeter squared per steradian (photons/sec/cm²/sr) (17,19). The light output was quantified by determining the total number of photons emitted per second using the Living Image 2.5 acquisition and imaging software (Xenogen, Alameda, CA, USA). Region-of-interest (ROI) measurements on the images were used to convert surface radiance (photons/sec/cm²/sr) to source flux or total flux of photons expressed in photons/seconds. The data were represented as pseudo-color images indicating light intensity (red and yellow, most intense) which were superimposed over grayscale reference photographs. For the acquisition of 3 dimensional (3D) images, we acquired grayscale photographs and structured light images followed by series of bioluminescent images using different wavelengths (560-660 nm). 3D images were created using diffuse luminescent imaging tomography (DLIT) algorithms, to reconstruct the position, geometry and strength of the internal light sources. The modifiable parameters were analysis across the wavelengths, source spectrum and tissue properties. (Living Image 3D Analysis Software, Xenogen, Alameda, CA, USA).

Size of Infarct

At day 8, mice were sacrificed by an overdose of anaesthetic, transcardially perfused with phosphate buffer solution (PBS) followed by a 4% paraformaldehyde (PFA) at pH 7.4. The brains were then cut in 35 μ m thick slices and stained using a Cresyl-Violet (CV) histological staining (21). The infarct volume (mm³) was calculated for each section of brain and quantified by using the NeuroLucida program (MBF Bioscience, Williston, VT, USA). Approximately 150 sections were analyzed per brain/per mouse. 9 to 15 mice were used for each experimental group.

Immunocytochemistry and tissue collection

The animals were anesthetised and transcardially perfused with PBS followed by a 4% paraformaldehyde (PFA) at pH 7.4. Tissue sample were then post-fixed overnight in 4%

PFA and then cryopreserved in phosphate-buffered 30% sucrose. As previously described immunofluorescence was carried out according to the following procedures: 35- μ m brain sections were blocked in TBS containing 5% goat serum and 0.20% Triton X-100 for 30 minutes (19). The sections were then incubated overnight at room temperature in primary antibody mouse monoclonal anti-GFAP (Sigma, Oakville, ON, Canada), followed by incubation with fluorescent goat Alexa Fluor® 488 secondary antiserum (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). GFAP immunoreactivity was quantified using Metamorph® Imaging System by measuring the intensity of fluorescence per unit of surface area (arbitrary units). 10 sections per mouse were used for this analysis. For the Figure 3, the data were averaged and analyzed by a Mann-Whitney test.

Statistical Analysis: All data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by post hoc comparison test (Bonferroni test). $P < 0.05$ was considered statistically significant.

2.7 RESULTS

Real-time imaging reveals estrogen-dependent modulation of GFAP signals in female mice

Astrocyte response to ischemic injury from live animals was studied in GFAP-luc mice. Previous work by Zhu and colleagues demonstrated that increase in GFAP signals correlates with astrogliosis in GFAP-luc mice (16). As shown in the figure 1, the animals were imaged 24 and 72 hrs and then 5 and 7 days following the surgery. A robust signal arising from the ischemic part of the brain was detected in all animals subjected to MCAO. The intensity of the signal peaked at 24 and 72 hours showing decline at days 5 and 7 (Fig.1 A-L). Our preliminary analysis revealed that the photon emission from the ischemic part of the brain was not detectable at day 0, 6-8 hours after surgery (data not shown). To our surprise, statistical analysis revealed that the signal intensities of total photon emission per second (p/s) of the GFAP signals in the first 24-72 hours were significantly higher in female mice when they were out of estrus as compared to male age-matched littermates (24 hrs after MCAO: females M/D vs males = $1.708 \times 10^7 \pm 0.192 \times 10^7$ vs $0.9170 \times 10^7 \pm 0.151 \times 10^7$ *** $p < 0.001$, n=7-9; 72 hrs after MCAO, females M/D vs males:

$1.243 \times 10^7 \pm 0.145 \times 10^7$ vs $0.362 \times 10^7 \pm 0.0357 \times 10^7$, *** $p < 0.001$, $n = 7-9$) (Fig.1 M). To investigate whether cyclic changes in levels of estrogen have an effect on astrocyte response to injuries, we daily monitored vaginal smears in order to determine the stage of estrus cycle. In addition, to further confirm the effects of higher levels of estrogen on astrocytes activation, we investigated the GFAP-signal induction after stroke in the mice treated with pharmacological doses of estrogen (replacement therapy). Compared to female mice in metestrus/diestrus, the female mice in estrus and the OVX mice on estrogen replacement therapy (pharmacological doses) showed significant decrease in GFAP signal induction after stroke. At 24 hrs after MCAO the values were: OVX-E2 = $0.362 \times 10^7 \pm 0.036 \times 10^7$; 72 hrs after MCAO: OVX-E2 = $0.327 \times 10^7 \pm 0.562 \times 10^7$ $n = 7$) (Fig.1 M).

Spatio-temporal distribution of bioluminescent signals in GFAP-luc mice correlates with GFAP immunoreactivity

To determine whether photons detected by CCD camera after cerebral ischemia were being emitted from the appropriate brain regions, we performed a 3D reconstruction of the recorded signals. In transient MCAO, 2-3 days following reperfusion, intensively stained GFAP positive astrocytes are situated in the areas surrounding the ischemic lesion (14,18). Reconstruction of the imaging samples (using diffuse luminescent imaging tomography), at six wavelengths (560 to 660 nm) across the emission spectrum of the source (Fig.2 A-F), revealed that the areas of the highest density photon emission (red and brown rectangles) were indeed situated in the areas surrounding the site of ischemic lesion (Fig.2 G-H). Because our imaging data revealed a significant difference in GFAP signals 24-72 hrs after stroke (out of 7 days of longitudinal imaging), we investigated whether our in vivo imaging results can be confirmed by immunocytochemistry. Consistent with the bioluminescent signal data, 72 hours after transient MCAO ischemic/reperfusion, injury was characterized by a robust increase in GFAP immunoreactivities in the areas at the periphery of ischemic lesion (Fig.3 A-C). Further analysis using a high magnification photomicrographs revealed that GFAP labeled astrocytes in female mice displayed more ramified morphology than the GFAP positive astrocytes surrounding the ischemic lesion in male mice (Fig.3 B-D) suggesting a higher activation state of the astrocytes (22). Quantitative analysis of

immunofluorescent labeling in the brain section of stroked mice revealed a significantly increase in the GFAP immunoreactivity in the female as compared to male mice (male: 13.40 ± 0.55 n=7; female: 16.96 ± 0.64 , n=9, ***p<0.0001) (Fig.3 E).

Chronic lack of estrogen increases astrocyte response to ischemic injury in female mice

Because physiologically and pharmacologically higher doses of estrogen attenuated GFAP up-regulation, we hypothesized that lack of estrogen in females should be then associated with higher GFAP signal induction in response to cerebral ischemia. Therefore, the same experimental protocol was performed on OVX female mice. To our surprise, the signal intensities following brain ischemia in OVX- GFAP-luc female mice when MCAO was performed 14 days after OVX were significantly smaller as compared to non-castrated female littermates out of estrus (Fig.4). However, when MCAO was performed 40 days after castration, we observed a significant increase in astrocyte response (GFAP up-regulation) to ischemic injury, suggesting that chronic estrogen deprivation may change astrocyte activation and inflammatory response in the brain (Fig.4).

GFAP up-regulation in cerebral ischemia differentially correlates with neuronal damage in male and female mice

Previous reports revealed a strong correlation between the increase in GFAP levels and neuronal damage in cerebral ischemia (23). Thus, one can potentially predict the gravity of ischemic lesion based on the intensity of detected GFAP signals. Since in our experiments we observed different astrocyte response in female and male mice, we wanted to investigate whether GFAP up-regulation would be a good biomarker and predictor of ischemic injury in both genders. As shown in figure 5A, the quantitative analysis of the CV stained brain sections (at the end of imaging protocols) revealed that size of ischemic lesion was in general significantly higher in male as compared to female mice: (male: 12.11 ± 1.361 n=7, female M/D: 8.366 ± 1.522 n=5, female P/E: 5.295 ± 0.900 n=6, OVX 14 days: 10.25 ± 1.706 n=7; OVX-E2: 4.598 ± 0.970 n=5; male vs female P/E: *** p= 0.0004, male vs OVX-E2: ***p= 0.0003). In addition, female GFAP-luc mice in estrus and OVX mice on the high dose estrogen therapy had significantly smaller lesions compared to other experimental

groups. Further, we investigated correlation between the levels photon emission/GFAP signal induction and the size of the infarction. In all experimental protocols, the same animal was imaged for 7 days and the stroke area was measured at the end of experimental protocol at day 8. Demonstrated in the figure 5B, bioluminescence signal intensities in GFAP-luc male mice showed a positive correlation with the size of the ischemic lesion ($r^2=0.5427;p=0.0063$). To our surprise, contrary to the findings in male mice, no correlation between bioluminescent signal intensities/GFAP induction and the size of infarctions was observed in any of the experimental group employing female GFAP-luc mice (Fig.5C-F). Interestingly, although the intensities of photon emission/GFAP signal induction differed within the different population of female GFAP-luc mice, depending on the levels of estrogen, the GFAP signal induction/astrocyte activation was not a good predictor of ischemic injury in any of the experimental group employing female mice.

2.8 DISCUSSION

We report here a novel live imaging approach to study astrocyte response to ischemic injury from the brains of living mice. Our results revealed a marked gender and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury. We report here that: i) bioluminescent signal intensities/GFAP induction were significantly higher in female mice (out of estrus) as compared to males (confirmed by immunohistochemistry) ii) in female mice, astrocyte response to ischemia/GFAP up-regulation was strongly dependent on estrus cycle and serum estrogen levels iii) contrary to the findings in male mice, there was no correlation between bioluminescent signal intensities/GFAP up-regulation and size of the ischemic lesion in female GFAP-luc mice.

GFAP is a 50 kDa intermediate filament predominantly expressed by mature astrocytes in the CNS (24, 25). Reactive astrogliosis is a key component of the inflammatory cellular response to CNS injury including ischemia (2,26). It is characterized by astrocytic hypertrophy and hyperplasia and the strong transcriptional up-regulation of GFAP expression (3,26). The astrocytes activation following brain ischemia is initiated within the first few days and may persist up to 7 days and longer after stroke (27,28). This was

confirmed by our live imaging results suggesting that GFAP-luc mouse represent a reliable model-system for in vivo analysis of astrocyte response to ischemic injury (Figs 3 and 4).

At the present, little is known on estrogen modulation of astrocyte activation/GFAP up-regulation in cerebral ischemia. Analysis of in vivo GFAP signals in our experiments showed that photon emissions 24-72 hrs after stroke were significantly higher in females as compared to male GFAP-luc mice (similar differences in GFAP activation were confirmed by immunohistochemistry). Importantly, this was changed when female mice entered estrus and/or when they were administered high pharmacological dose of estrogen suggesting that estrogen may affect astrocyte response (GFAP up-regulation) to ischemic injury. This is in agreement with the recent reports from Martinez and de Lacalle in which the authors demonstrated direct influence of gonadal hormones on the morphology and functional response of glial cells, particularly astrocytes, to brain injuries (29).

The question that arises here is: what are the possible explanations for this estrogen dependent astrocytes response to ischemic injury? Previous studies on non-injured astrocytes demonstrated cyclic, estrus-dependent variations of GFAP expression in certain nuclei of the rat brain (30-32). In addition, a putative estrogen responsive element (ERE) binding site has been detected in the 5'-upstream region of the human and rat GFAP promoter thus suggesting that the level of circulating gonadal hormones would predict or modulate glial response to brain injury (33). Importance of gonadal hormones in modulation of astrocyte response to injuries was further confirmed in our hormone-deprivation experiments. Although at the early time-point after OVX, we did not observe increase in astrocyte response following MCAO, which may be in part explained by compensatory mechanisms and/or by higher P450 aromatase activity in astrocytes³⁴ as a source of non-gonadal estrogens. In contrast, the chronic deprivation of gonadal hormones was associated with strong increase in astrocyte response to ischemia. Similar time course of astrocyte responsiveness to injury in OVX mice was observed by McAsey et al. (35).

However, the most striking result that emerged from our live imaging study was the marked gender difference in astrocyte response to cerebral ischemia. Although gender effect has been a known factor in stroke studies, the previous reports have been mostly focused on the direct neuroprotective effects of estrogens (36-39). For example, physiological levels of

estrogens have been shown to confer neuroprotection against stroke-related injury in young and middle aged rats (37,40). Conversely, treatment with the estrogen receptor antagonists exacerbated ischemic injury in female mice (41). In addition, recent study demonstrated that estradiol treatment following cerebral ischemia enhances neurogenesis (39). Our results are in line with the previous evidence. Namely, ischemic lesions were in general smaller in female mice when compared to GFAP-luc males. Moreover, the infarcts were significantly smaller in females during estrus and in the females on estrogen replacement therapy (pharmacological doses), thus confirming a direct neuroprotective effects of estrogen in ischemia (Fig.5 A). However, contrary to the findings in male mice where positive correlation was observed between bioluminescent signal intensities/GFAP up-regulation and the size of infarctions, there was no correlation between GFAP-up-regulation/astrocyte responses and infarct size in any of the experimental groups employing female GFAP-luc mice, thus suggesting that GFAP up-regulation/astrocyte response to ischemic injury may not have the same functional significance in male and female mice.

In conclusion, our results revealed a marked gender and estrogen effects on astrocyte response to ischemic injury. In addition, the results of our study revealed that GFAP up-regulation may have different functional significance in female and male experimental animals and may not directly reflect the extent of ischemic brain damage in female GFAP-luc mice. Using novel live imaging approach, we demonstrated that early-phase inflammatory response in ischemia may be associated with gender-specific injury markers.

2.9 ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and Quebec Transgenic Research Network (QTRN). J.K. is recipient of the Career Award from the R&D/ Health Research Foundation and CIHR. M.L-H. is recipient of a CIHR Canada Doctoral Scholarship. We thank G. Soucy for technical help in estrogen replacement experiments.

2.10 References

1. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: Cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.*1997;20:570-577
2. Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol.*1998;56:149-171
3. Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 2005;50:427-434
4. Schneider JS, Denaro FJ. Astrocytic responses to the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (mptp) in cat and mouse brain. *J Neuropathol Exp Neurol.*1988;47:452-458
5. Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.*2004;25:663-674
6. Almer G, Vukosavic S, Romero N, Przedborski S. Inducible nitric oxide synthase up-regulation in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.*1999;72:2415-2425
7. Kriz J, Gowing G, Julien JP. Efficient three-drug cocktail for disease induced by mutant superoxide dismutase. *Ann Neurol.*2003;53:429-436
8. Herrmann M, Ehrenreich H. Brain derived proteins as markers of acute stroke: Their relation to pathophysiology, outcome prediction and neuroprotective drug monitoring. *Restor Neurol Neurosci.*2003;21:177-190
9. Vissers JL, Mersch ME, Rosmalen CF, van Heumen MJ, van Geel WJ, Lamers KJ, Rosmalen FM, Swinkels LM, Thomsen J, Herrmann M. Rapid immunoassay for the determination of glial fibrillary acidic protein (gfap) in serum. *Clin Chim Acta.*2006;366:336-340
10. Petzold A, Keir G, Kerr M, Kay A, Kitchen N, Smith M, Thompson EJ. Early identification of secondary brain damage in subarachnoid hemorrhage: A role for glial fibrillary acidic protein. *J Neurotrauma.*2006;23:1179-1184
11. Pekny M. Astrocytic intermediate filaments: Lessons from gfap and vimentin knock-out mice. *Prog Brain Res.*2001;132:23-30
12. Nawashiro H, Messing A, Azzam N, Brenner M. Mice lacking gfap are hypersensitive to traumatic cerebrospinal injury. *Neuroreport.*1998;9:1691-1696

13. Pekny M, Johansson CB, Eliasson C, Stakeberg J, Wallen A, Perlmann T, Lendahl U, Betsholtz C, Berthold CH, Frisen J. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol.*1999;145:503-514
14. Chen H, Chopp M, Schultz L, Bodzin G, Garcia JH. Sequential neuronal and astrocytic changes after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci.*1993; 118:109-106
15. Li Y, Chopp M, Zhang ZG, Zhang RL. Expression of glial fibrillary acidic protein in areas of focal cerebral ischemia accompanies neuronal expression of 72-kda heat shock protein. *J Neurol Sci.*1995;128:134-142
16. Zhu L, Ramboz S, Hewitt D, Boring L, Grass DS, Purchio AF. Non-invasive imaging of gfap expression after neuronal damage in mice. *Neurosci Lett.*2004;367:210-212
17. Maysinger D, Behrendt M, Lalancette-Hebert M, Kriz J. Real-time imaging of astrocyte response to quantum dots: In vivo screening model system for biocompatibility of nanoparticles. *Nano Lett.*2007
18. Weng YC, Kriz J. Differential neuroprotective effects of a minocycline-based drug cocktail in transient and permanent focal cerebral ischemia. *Exp Neurol.*2007
19. Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci.*2007;27:2596-2605
20. Soucy G, Boivin G, Labrie F, Rivest S. Estradiol is required for a proper immune response to bacterial and viral pathogens in the female brain. *J Immunol.*2005;174:6391-6398
21. Tureyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Dempsey RJ. Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: A comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. *J Neurosci Methods.*2004;139:203-207
22. Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2006;103:17513-17518
23. Herrmann M, Vos P, Wunderlich MT, de Bruijn CH, Lamers KJ. Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke: A comparative analysis of serum concentrations of protein s-100b and glial fibrillary acidic protein. *Stroke.*2000;31:2670-2677
24. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: Gfap-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.*2000;25:1439-1451

- 25.Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments: Molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annu Rev Biochem.*2004;73:749-789
- 26.Clark RK, Lee EV, Fish CJ, White RF, Price WJ, Jonak ZL, Feuerstein GZ, Barone FC. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: An immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res Bull.*1993;31:565-572
- 27.Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci.*1999;22:391-397
- 28.Stoll G, Jander S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the cns. *Prog Neurobiol.*1999;58:233-247
- 29.Martinez L, de Lacalle S. Astrocytic reaction to a lesion, under hormonal deprivation. *Neurosci Lett.*2007;415:190-193
- 30.Garcia-Segura LM, Chowen JA, Parducz A, Naftolin F. Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: Cellular mechanisms. *Prog Neurobiol.*1994;44:279-307
- 31.Kohama SG, Bethea CL. Steroid regulation of tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid in dopaminergic subpopulations of monkey hypothalamus. *Endocrinology.*1995;136:1790-1800
- 32.Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE, Anderson CP, Finch CE. Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotein e-dependent mechanism: Implications for alzheimer's disease. *J Neurosci.*1998;18:3180-3185
- 33.Laping NJ, Teter B, Nichols NR, Rozovsky I, Finch CE. Glial fibrillary acidic protein: Regulation by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathol.*1994;4:259-275
- 34.Liu M, Hurn PD, Roselli CE, Alkayed NJ. Role of p450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *J Cereb Blood Flow Metab.*2007;27:135-141
- 35.McAsey ME, Cady C, Jackson LM, Li M, Randall S, Nathan BP, Struble RG. Time course of response to estradiol replacement in ovariectomized mice: Brain apolipoprotein e and synaptophysin transiently increase and glial fibrillary acidic protein is suppressed. *Exp Neurol.*2006;197:197-205
- 36.Rusa R, Alkayed NJ, Crain BJ, Traystman RJ, Kimes AS, London ED, Klaus JA, Hurn PD. 17beta-estradiol reduces stroke injury in estrogen-deficient female animals. *Stroke.*1999;30:1665-1670
- 37.Dubal DB, Wise PM. Neuroprotective effects of estradiol in middle-aged female rats. *Endocrinology.*2001;142:43-48

38. McCullough LD, Hurn PD. Estrogen and ischemic neuroprotection: An integrated view. *Trends Endocrinol Metab.*2003;14:228-235
39. Suzuki T, Shimizu T, Yu HP, Hsieh YC, Choudhry MA, Schwacha MG, Chaudry IH. Tissue compartment-specific role of estrogen receptor subtypes in immune cell cytokine production following trauma-hemorrhage. *J Appl Physiol.*2007;102:163-168
40. Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Kindy MS, Wise PM. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.*2001;98:1952-1957
41. Sawada M, Alkayed NJ, Goto S, Crain BJ, Traystman RJ, Shaivitz A, Nelson RJ, Hurn PD. Estrogen receptor antagonist ICI162,780 exacerbates ischemic injury in female mouse. *J Cereb Blood Flow Metab.*2000;20:112-118

2.11 FIGURES

FIGURE 1

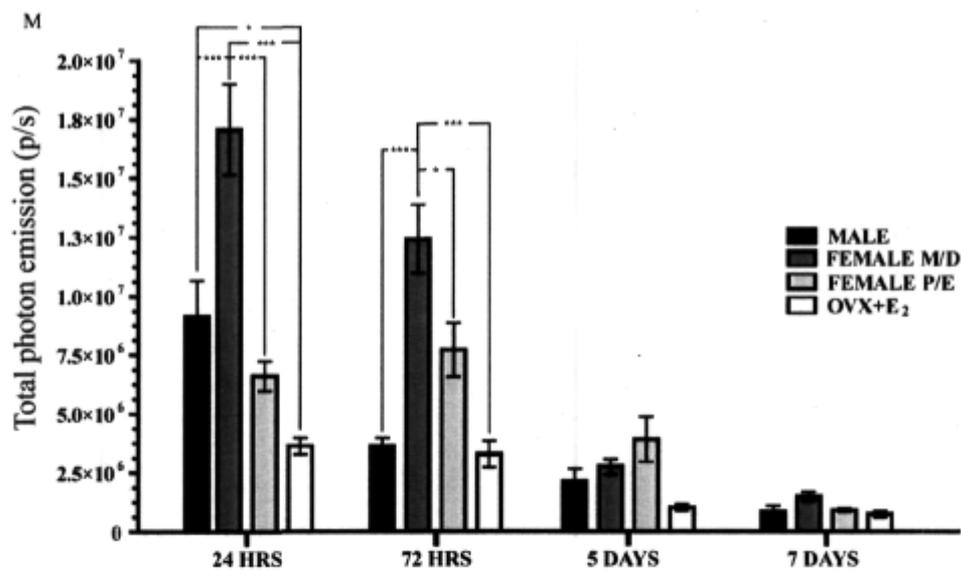
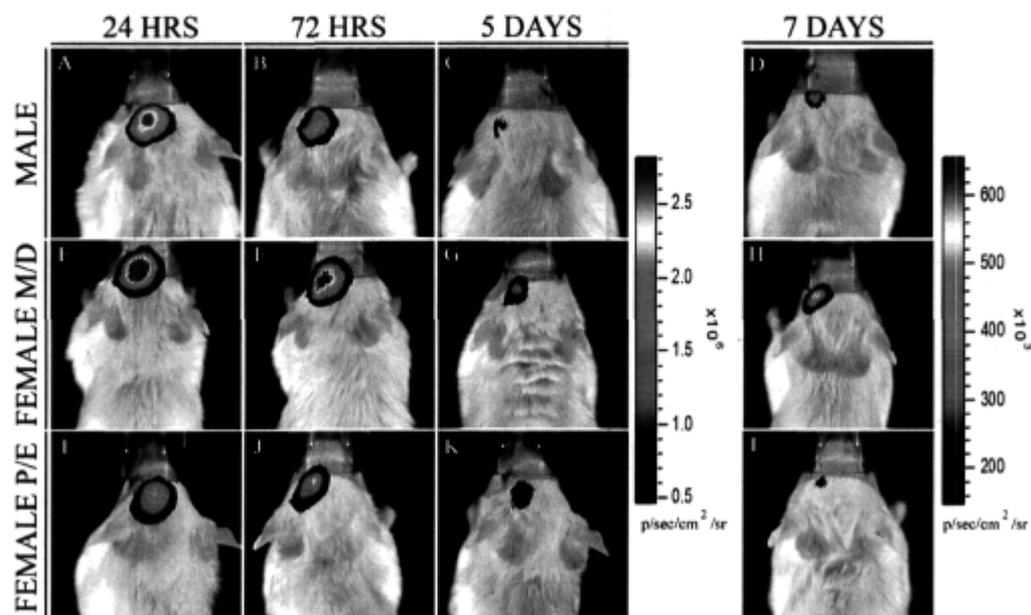


FIGURE 2

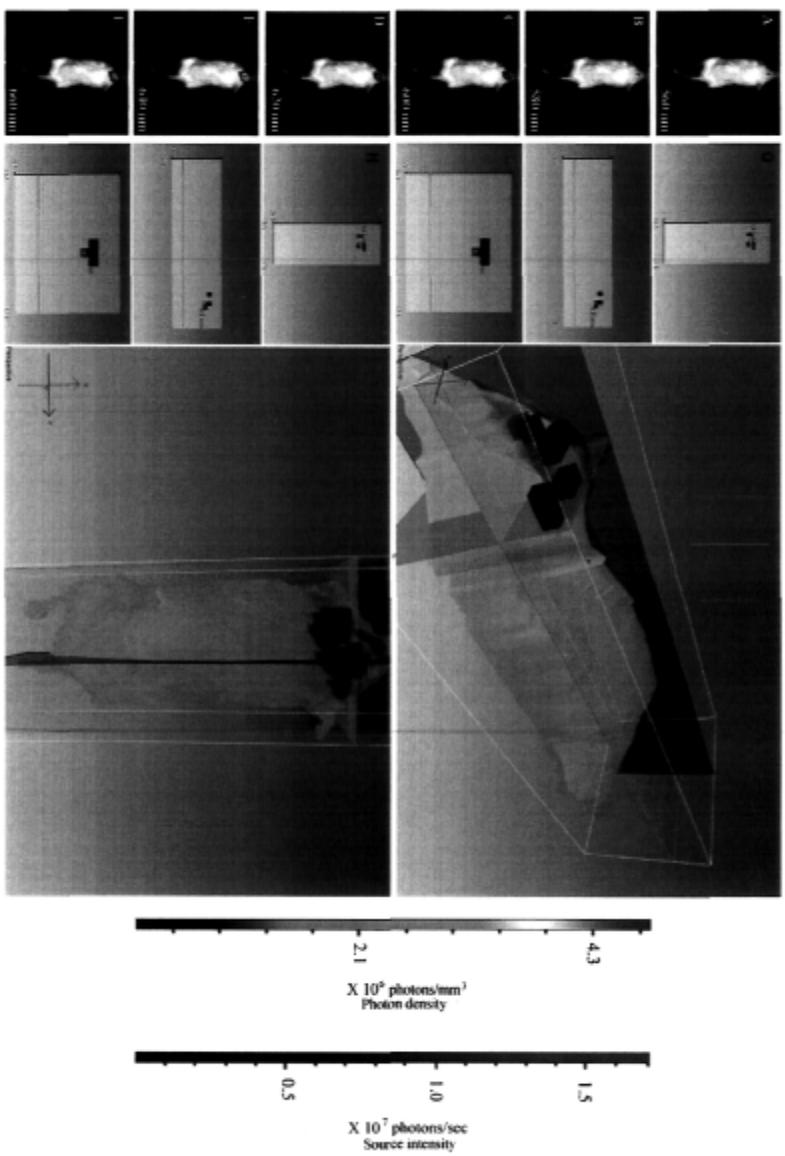


FIGURE 3

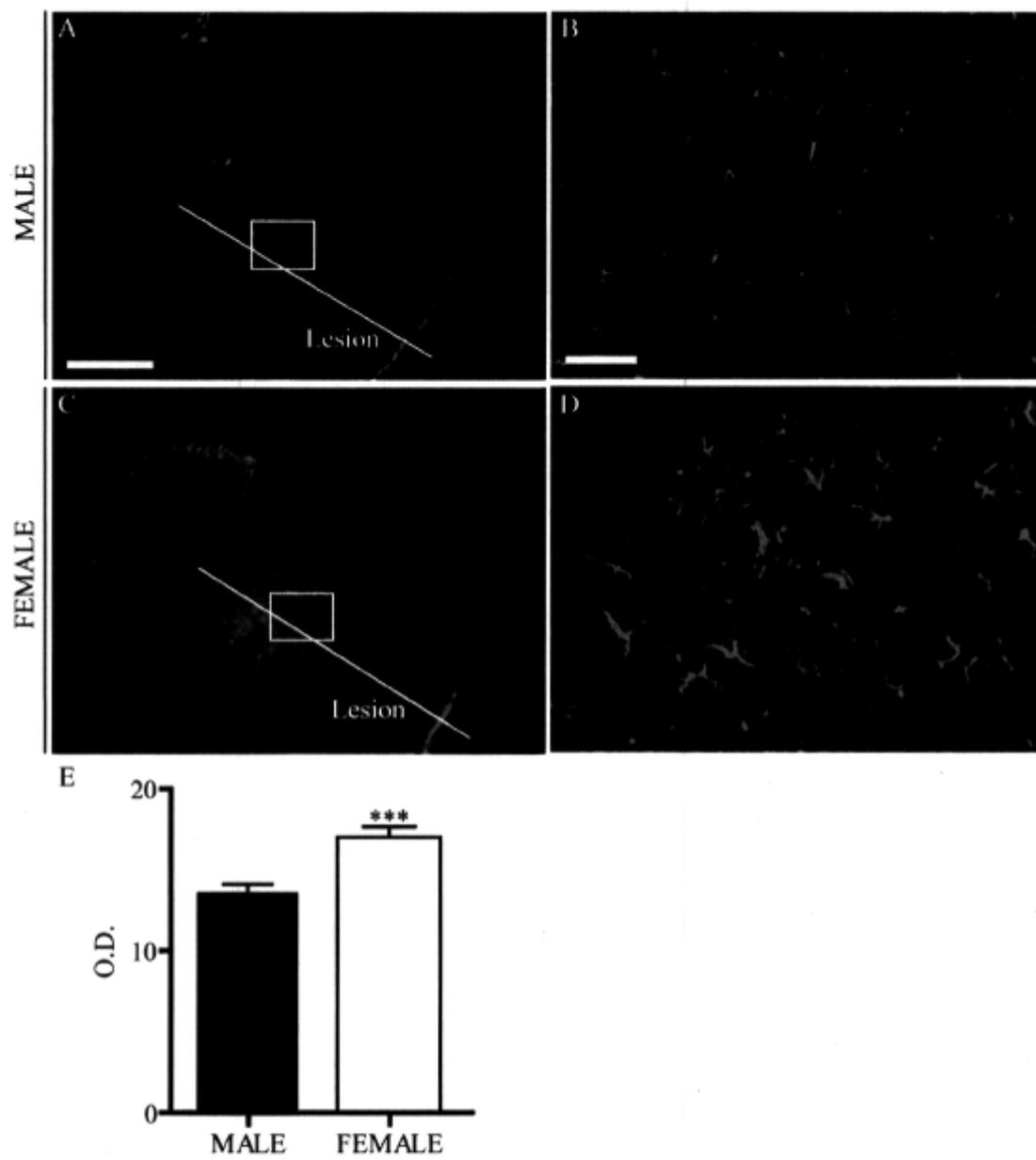


FIGURE 4

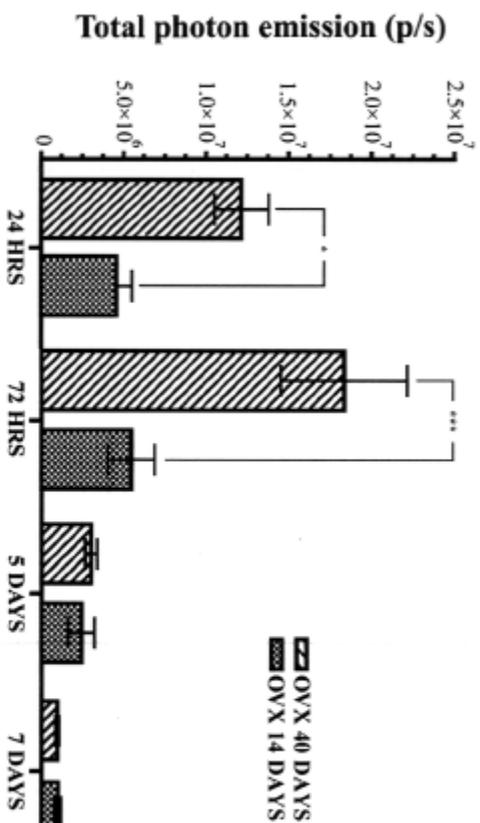
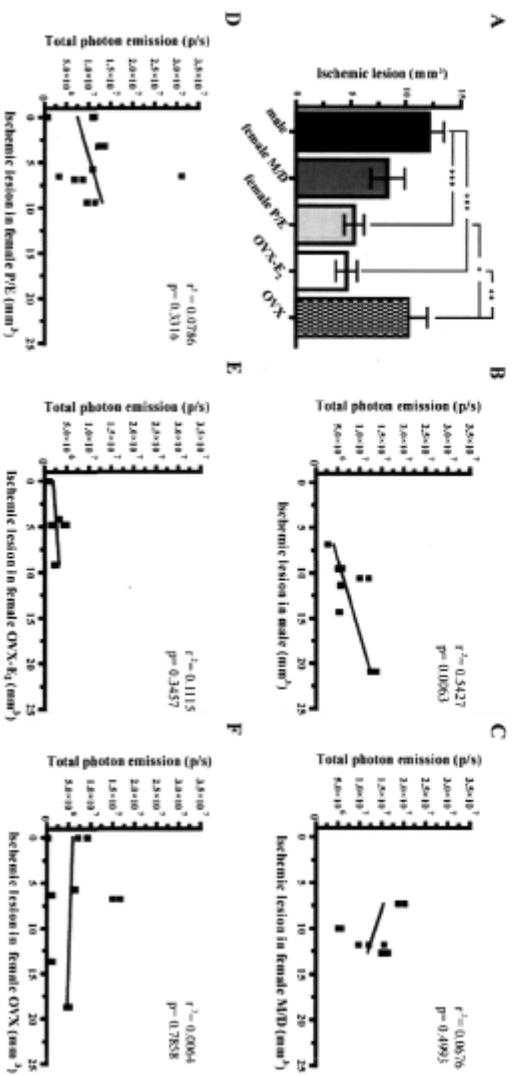


FIGURE 5



2.12 FIGURE LEGENDS

Figure 1. Real-time visualization of bioluminescent GFAP signals after cerebral ischemia. Representative images of male (A-D), female in metestrus/diestrus (M/D) (E-H) and female in proestrus/estrus (P/E) (I-L) GFAP-luc mice imaged at 24 and 72 hours followed by 5 and 7 days after 60 minutes MCAO. The images were longitudinally recorded from the same experimental animal revealing the dynamics of astrocyte activation throughout the 7 days. The scales on the right are the color maps for photon counts. (M) Quantification of luciferase signals using LivingImage software (Xenogen- Caliper Life Sciences, Alameda, CA, USA) revealed higher GFAP signal induction in female M/D mice.

Figure 2. 3D reconstruction of bioluminescent signals emitted from the brains of stroked GFAP-luc mice 72 hours after MCAO. (A-F) Representative images show collection of imaging samples at six different wavelengths across the emission spectrum of the bioluminescent source with the substantial fraction of the light 600 nm (D-E). Using DLIT algorithms and structural images (Living Image 3D software, Xenogen- Caliper Life Sciences, Alameda, CA, USA) the data was transformed to 3D images (G, H). Red and brown rectangles (concentrated around the predicted ischemic lesion) represent the areas of the brain with highest intensity of the photon emission. The localization of the highest intensity area was measured and presented in 3 axes (x, y and z) in mm from the skull surface, small panels on the left (G, H). The scales on the right are the color maps for photon density and source intensity.

Figure 3. Representative photomicrographs of male and female GFAP stained brain sections 72 hours after MCAO. The immunofluorescent labeling showed higher GFAP immunoreactivity in the areas at the periphery of the ischemic lesion (A and C). Higher magnification photomicrographs revealed more ramified morphology of activated astrocytes in female as compared to male mice (B and D). Densitometry quantification revealed significant higher levels of GFAP expression in the brain sections of female mice (male: 13.40 ± 0.55 n=7; female: 16.96 ± 0.64 n=9, ***p<0.0001). Scale bars, 500 μ m for A and C; 50 μ m for B and D.

Figure 4. The histograms represent total photon emission (quantification of GFAP signals) measured in GFAP-luc mice after 60 minutes MCAO, 40 (OVX 40 days) and 14 days (OVX 14 days) of estrogens deprivation. Higher GFAP induction signal was observed in the experimental group OVX 40 days at 24 and 72 hours (24 hrs: OVX 40 days vs OVX 14 days: $1.214 \times 10^7 \pm 0.165 \times 10^7$, $0.457 \times 10^7 \pm 0.095 \times 10^7$; 72 hrs: $1.83 \times 10^7 \pm 0.38 \times 10^7$ vs $0.545 \times 10^7 \pm 0.014 \times 10^7$ n=5)

Figure 5. The histogram represents the size (volume) of ischemic lesion in mm³ measured 8 days following 60 minutes MCAO (A). The ischemic lesions were significantly smaller in female P/E, OVX and OVX-E2 mice compare to male. (B) Correlation analysis between size of the lesion and GFAP intensity signals revealed positive correlation in male GFAP-luc mice while no correlation was observed between size of the ischemic lesion and GFAP intensity signals in female M/D (C), female P/E (D), OVX female (E) and OVX-E2 (F) GFAP-luc mice (D). Note that at day 8, after 60 minutes transient MCAO, the ischemic

lesions were in general rather small since the processes of the spontaneous recovery has been already initiated.

CHAPITRE 3

Conclusion

La protéine GFAP est un filament intermédiaire principalement exprimé par les astrocytes matures dans le SNC et l'activation des astrocytes est un élément important de la réponse inflammatoire cellulaire après une blessure au système nerveux (Herrmann, 2004). L'astroglie est caractérisée par l'hypertrophie, l'hyperplasie et l'augmentation de l'expression de la protéine GFAP (Clark, 1993). L'activation des astrocytes est initiée dans les 24 heures suivants une ischémie cérébrale et peut persister jusqu'à 7 jours (Dirnagl, 1999). Ces résultats furent confirmés en imagerie *in vivo* dans notre modèle murin, ce qui suggère que, pour analyser la réponse astrocytaire, la souris GFAP-luc est un modèle fidèle et valide.

Nos résultats démontrent clairement une réponse astrocytaire différente en fonction du sexe et des concentrations d'hormones stéroïdiennes, l'oestrogène, présentes chez l'animal. En effet, nous avons démontré en premier lieu, que l'intensité du signal/induction de la protéine GFAP est significativement plus élevée chez les souris femelles qui ont de faible concentration physiologique d'oestrogènes circulants, lorsque comparées aux mâles. Ces résultats furent aussi confirmés par la détection de la protéine GFAP par immunohistochimie. En deuxième lieu, chez les souris femelles, l'augmentation de l'expression de la protéine GFAP suite à l'ischémie cérébrale est fortement dépendante du cycle oestral et du niveau d'oestrogène circulant dans le sang. Finalement, contrairement aux résultats obtenus chez les mâles, il n'y a pas de corrélation entre l'intensité du signal mesuré en bioluminescence et le volume de la lésion ischémique chez tous les groupes de souris femelles GFAP-luc.

Le rôle des oestrogènes sur l'activation des astrocytes, suite à une ischémie cérébrale, demeure méconnu. Par contre, l'analyse de l'émission photonique, résultant de l'activation du promoteur de la protéine GFAP à 24 et 72 heures après le MCAo, est significativement plus élevée chez les femelles qui ont des concentrations d'oestrogènes circulantes faibles, lorsque comparée aux mâles GFAP-luc. Par contre, les mesures d'activation de la protéine GFAP sont significativement moins élevée lorsque les souris femelles sont en oestrus ou

lorsqu'on leur administre des doses pharmacologiques d'oestrogènes. Ces résultats suggèrent que les oestrogènes modulent la réponse des astrocytes suite à une ischémie cérébrale. Cette hypothèse est en accord avec une étude effectuée par le groupe de Martinez et al qui soutient que les hormones gonadiques ont une influence directe sur la morphologie et sur la réponse fonctionnelle des cellules gliales, en particulier les astrocytes, après une lésion cérébrale (Martinez, 2007).

Voici quelques raisons qui expliqueraient pourquoi la réponse astrocytaire est modulée par les oestrogènes après une ischémie cérébrale. Premièrement, des études antérieures effectuées sur des astrocytes intacts chez des rats adultes ont démontré qu'il y a des variations cycliques de l'expression de la protéine GFAP en fonction du cycle oestral dans certaines régions du cerveau du rat (Garcia-Segura, 1994). Deuxièmement, la présence d'un élément de réponse aux oestrogènes (ERE) a été détecté dans la région 5' en amont du promoteur de la protéine GFAP chez l'humain et chez le rat, ce qui suggère que le niveau d'hormones gonadiques peut moduler la réponse gliale suite à une ischémie cérébrale (Laping, 1994). L'effet répresseur des hormones stéroïdes sur l'activation de la protéine GFAP dans les astrocytes a d'ailleurs été confirmé dans notre expérience. De plus, aucune augmentation de l'expression de la protéine GFAP à 24 et 72 heures après l'ischémie cérébrale transitoire ne fut observée chez les souris OVX. La mise en place de mécanismes compensatoires pourrait expliquer ce résultat. Un mécanisme compensatoire probable impliquerait l'activité de l'enzyme aromatasase p450 dans les astrocytes. L'aromatase p450 est l'enzyme clé de la biosynthèse des oestrogènes. Dans les astrocytes, cette enzyme synthétise de l'oestrogène à partir d'androgènes (Liu, 2007). Ce mécanisme ne semble pas suffisant à long terme, car une privation prolongée d'hormones stéroïdes engendre une forte augmentation de la réponse des astrocytes après une ischémie cérébrale (McAsey, 2006).

Un des résultats observés lors de notre étude est la différence marquée entre les mâles et les femelles en réponse à une ischémie cérébrale. Malgré que la différence entre les sexes soit un facteur connu dans les études faites dans le domaine de l'ischémie, les études antérieures étaient plus concentrées sur l'effet neuroprotecteur direct de l'oestrogène (McCullough, 2003). Par exemple, des doses physiologiques d'oestrogènes ont un rôle neuroprotecteur contre les dommages causés par l'ischémie cérébrale chez les souris jeunes et adultes

(Dubal, 2001). Inversement, traiter les souris avec un antagoniste des récepteurs oestrogéniques augmente les dommages causés par l'ischémie cérébrale chez les femelles (Sawada, 2000). De plus, des études récentes utilisant l'oestradiol comme traitement après une ischémie cérébrale montrent une augmentation de la neurogenèse (Suzuki, 2007). Les lésions ischémiques mesurées chez les souris femelles GFAP-luc (sauf le groupe OVX) sont inférieures à celle mesurée chez les mâles GFAP-luc. Les zones endommagées sont plus petites chez les souris en oestrus et chez les femelles traitées avec le 17β -oestradiol. Il y a donc un effet neuroprotecteur de l'oestrogène sur l'ischémie cérébrale. Toutefois, contrairement aux résultats obtenus chez les mâles, où il y a une corrélation positive entre l'intensité du signal GFAP et le volume de la zone affectée, aucune corrélation dans tous les groupes de souris femelles GFAP-luc n'est observée. Cela suggère que la surexpression de la protéine GFAP en réponse à une ischémie cérébrale pourrait ne pas avoir la même fonction chez les souris mâles et femelles.

En effet, la surexpression de la protéine GFAP ne reflète pas directement l'ampleur des dommages dans le cerveau des souris femelles GFAP-luc. L'utilisation de l'imagerie en bioluminescence *in vivo* nous a donc permis de démontrer que la réponse inflammatoire engendrée tôt après une ischémie cérébrale pourrait être associée à des marqueurs spécifiques selon le sexe.

Afin de compléter l'étude utilisant les souris GFAP-luc, il serait intéressant d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués dans la modulation des astrocytes par les oestrogènes. Pour ce faire, nous allons croiser les souris GFAP-luc avec des souris déficientes (KO) pour un gène spécifique aux récepteurs des oestrogènes (ER- α et ER- β). De cette façon, nous allons pouvoir déterminer lequel des deux récepteurs, en condition physiologique, est impliqué dans la modulation de l'expression de la protéine GFAP, suite à une ischémie cérébrale.

De plus, pour vérifier l'implication de l'activité de l'aromatase dans les astrocytes après une ischémie cérébrale chez les souris OVX, il serait intéressant de la mesurer en plus de confirmer quel type cellulaire produit l'oestrogène. Pour ce faire, nous pouvons détecter l'expression de l'aromatase p450 à l'aide d'un anticorps. Pour confirmer son implication,

nous pourrions bloquer son activité à l'aide de fradrozole et par la suite quantifier l'impact sur la région lésée ainsi que sur l'expression de la GFAP (McCullough, 2003).

Les microglies, un autre type de cellules gliales, réagissent aussi lors de traumatismes cérébraux et l'activation microgliale est une composante principale de la réponse innée. Il a d'ailleurs été démontré que l'élimination sélective des microglies en prolifération aggrave les dommages causés par l'ischémie cérébrale (Lalancette-Hebert, 2007). Ainsi, les microglies ont un rôle important à jouer dans la modulation de la réponse inflammatoire lors d'ischémie cérébrale et lors de traumatismes crâniens. De plus, tout comme les astrocytes, les microglies possèdent des récepteurs oestrogéniques (Pozzi S, 2006). En se basant sur ces faits et nos résultats préliminaires, il serait important d'étudier les autres mécanismes par lesquels les oestrogènes modulent la réponse neuroinflammatoire du cerveau suite à une ischémie cérébrale. Pour ce faire, nous allons utiliser des souris transgéniques qui expriment le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur TLR2. Ce récepteur est impliqué dans la réponse innée immunitaire et fait partie de la classe des TLRs « toll-like receptors » qui comprend 13 orthologues dont 10 sont exprimés chez l'homme. Les récepteurs de type TLR2 sont situés sur les cellules résidentes impliquées dans l'immunité innée (les microglies) et leurs activations entraînent une réponse inflammatoire lorsqu'ils détectent des structures moléculaires pathogènes. Des études récentes ont aussi démontrées que l'ARN messager du récepteur TLR2 était surexprimée en réponse à une ischémie cérébrale (Lehnard, 2007). L'imagerie de la réponse microgliale dans les souris TLR2-Luc *in vivo* rendra alors possible l'observation de l'effet modulateur des oestrogènes sur la réponse inflammatoire. Toujours dans le but créer un modèle expérimental représentatif. À la suite de ce projet et tout comme lors du projet avec les souris GFAP-Luc, il sera important de déterminer si l'expression des récepteurs ER α et ER β est modifié lors de la stimulation des récepteurs TLR2, ainsi que les mécanismes menant à cette modulation. Nous allons donc aussi effectuer des MCAo aux souris TLR2-Luc-ER α KO et TLR2-Luc-ER β KO. Nous allons ainsi pouvoir évaluer l'implication des récepteurs sur l'activation des astrocytes suite à une ischémie cérébrale.

Finalement, en fonction des résultats obtenus et des mécanismes découverts, nous allons pouvoir étudier le potentiel thérapeutique d'une hormone stéroïdienne, d'un agoniste ou d'un antagoniste administrable après une ischémie cérébrale.

De plus, étudier l'effet de la progestérone sur l'ischémie cérébrale est aussi une avenue prometteuse, car cette hormone est aussi administrée lors d'hormonothérapie substitutive, sans être autant étudié que l'oestrogène.

Bibliographie

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurosciences, A la découverte du cerveau, Marseille: Édition Pradel, 2002. 898p.

Brown AM, Ransom BR. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*. 2007;55:1263-1271

Clark RK, Lee EV, Fish CJ, White RF, Price WJ, Jonak ZL, Feuerstein GZ, Barone FC. Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: An immunohistochemical and quantitative planimetric study. *Brain Res Bull*.1993;31:565-572

Contag CH, Bachmann MH. Advances in In Vivo Bioluminescence Imaging of Gene Expression. *Annu.Rev.Biomed.Eng*. 2002; 4: 235-260

Correale J, Villa A. The blood-brain-barrier in multiple sclerosis: Functional roles and therapeutic targeting. *Autoimmunity*. 2007; 40(2): 148-160

Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindsey J, Golding TS, Lubahn DB, Smithies O, Korach KS. Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female Mouse after Targeted Disruption of the estrogen receptor Gene. *Mol endo*. 1995;9:1442-1454

Culmsee C, Vedder H, Ravati A, Junker V, Otto D, Ahlemeyer B, Krieg JC, Kriegstein J. Neuroprotection by estrogens in a mouse model of focal cerebral ischemia and in cultured neurons:evidence for a receptor-independent antioxidative mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(11): 1263-1269

Danton GH, Dietrich WD. Inflammatory Mechanisms after Ischemia and Stroke. *J Neuro Exp Neuro*. 2003; 62:127-136

Dhandapani KM, Wade FM, Mahesh VB, Brann DW. Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol:involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology*. 2005;146(6):2749-2759

Dienel GA, Hertz L. Astrocytic contributions to bioenergetics of cerebral ischemia. *Stroke*. 2005; 50:362-388

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view. *Trends Neurosci*.1999;22:391-397

Dubal DB, Wise PM. Neuroprotective effects of estradiol in middle-aged female rats. *Endocrinology*.2001;142:43-48

Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007;87:179-197

Eng LF, Albert CH, Lee YL. Astrocytic response to injury. *Progress in brain Research*. 1992; 353-365

Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: Gfap-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*.2000;25:1439-1451

Garcia-Ovejero D, Azcoitia I, DonCarlos LL, Melcangi RC, Garcia-Segura LM. Glia-neuron crosstalk in the neuroprotective mechanisms of sex steroid hormones. *Brain Research Reviews*. 2005;48:273-286

Garcia-Segura LM, Chowen JA, Parducz A, Naftolin F. Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: Cellular mechanisms. *Prog Neurobiol*.1994;44:279-307

Gibson CL, Gray LJ, Murphy SP, Bath PMW. Estrogens and experimental ischemic stroke: a systemic review. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26:1103-1113

Herrmann H, Aebi U. Intermediate filaments: Molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular scaffolds. *Annu Rev Biochem*.2004;73:749-789

Herrmann M, Ehrenreich H. Brain derived proteins as markers of acute stroke: Their relation to pathophysiology, outcome prediction and neuroprotective drug monitoring. *Restor Neurol Neurosci*.2003;21:177-190

Hoffman GE, Merchenthaler I, Zup SL. Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. *Endocrine*. 2006; 2: 217-231

Hurn PD, Brass LM. Estrogen and stroke a balanced analysis. *Stroke*. 2003; 34 :338-341

Iijima T, Mies G, Hossmann KA. Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: effect on volume of ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1992; 12(5) :727-733

Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski, RA. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci*. 1990; 10(5):1583-1591

Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci*.2007;27:2596-2605.

Laping NJ, Teter B, Nichols NR, Rozovsky I, Finch CE. Glial fibrillary acidic protein: Regulation by hormones, cytokines, and growth factors. *Brain Pathol*.1994; 4:259-275

Lehnardt S, Lehmann S, Kaul D, Tschimmel K, Hoffmann O, Cho S, Krueger C, Nitsch R, Meisel A, Weber JR. Toll-like receptor 2 mediates CNS injury in focal cerebral ischemia. *J Neuroimmunol.* 2007 Oct;190(1-2):28-33

Liu M, Hurn PD, Roselli CE, Alkayed NJ. Role of p450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *J Cereb Blood Flow Metab.*2007; 27:135-141

Marieb EN, Laurendeau G. Anatomie et physiologie humaines, Québec: ERPI, 1993. 1014p.

Martinez L, de Lacalle S. Astrocytic reaction to a lesion, under hormonal deprivation. *Neurosci Lett.*2007;415:190-193

McAsey ME, Cady C, Jackson LM, Li M, Randall S, Nathan BP, Struble RG. Time course of response to estradiol replacement in ovariectomized mice: Brain apolipoprotein e and synaptophysin transiently increase and glial fibrillary acidic protein is suppressed. *Exp Neurol.*2006;197:197-205

McCullough LD, Hurn PD. Estrogen and ischemic neuroprotection: An integrated view. *Trends Endocrinol Metab.*2003;14:228-235

Miller DW. Immunobiology of the blood-brain barrier. *J NeuroVirolo.* 1999; 5:570-578

Nedergaard M, Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia.* 2005;50:281-286

Panickar KS, Norenberg MD. Astrocytes in cerebral ischemic injury: Morphological and general considerations. *Glia.* 2005; 50:287-298

Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia.* 2005;50:427-434

Pekny M, Wilhelmsson U, Bogestal YR, Pekna M. The role of astrocytes and complement system in neuronal plasticity. *Int Rev Neurobiol.* 2007; 82:95-111

Pozzi S., Benedusi V., Maggi A., Vegeto E. Estrogen action in neuroprotection and brain inflammation. 2006. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1089 :302-323.

Pritchett KR, Taft RA. The Mouse in biomedical research, second edition, Volume 3, Normative biology, husbandry, and models, États-Unis: American College of Laboratory Animal Medicine Series, Academic Press, 2007 792p.

Rozovsky I, Wei M, Stone DJ, Zanjani H, Anderson CP, Morgan TE, Finch CE. Estradiol (E2) enhances neurite outgrowth by repressing glial fibrillary acidic protein expression and reorganizing laminin. *Endo.* 2002; 143(2): 636-64

Sampei K, Goto S, Alkayed NJ, Crain BJ, Korach KS, Traystman RJ, Demas GE, Nelson RJ, Hurn PD. Stroke in estrogen receptor- α -Deficient Mice. *Stroke.* 2000;31 :738-744

Sawada M, Alkayed NJ, Goto S, Crain BJ, Traystman RJ, Shaivitz A, Nelson RJ, Hurn PD. Estrogen receptor antagonist ICI 162,780 exacerbates ischemic injury in female mouse. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:112-118

Stoll G, Jander S, Schroeter M. Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol.* 1998;56:149-171

Suzuki T, Shimizu T, Yu HP, Hsieh YC, Choudhry MA, Schwacha MG, Chaudry IH. Tissue compartment-specific role of estrogen receptor subtypes in immune cell cytokine production following trauma-hemorrhage. *J Appl Physiol.* 2007;102:163-168

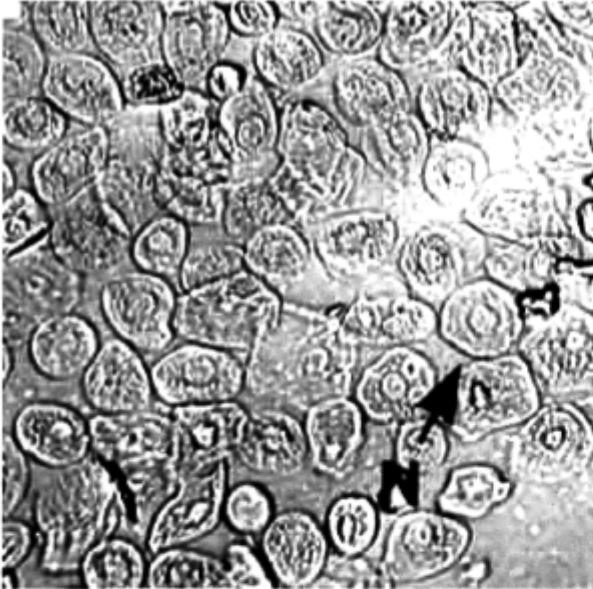
Toran-Allerand CD. Estrogen and the brain: beyond ER- α and ER- β . *Exp Gerontol.* 2004;34:1579-1586

Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol.* 2006; 184(1-2):53-68

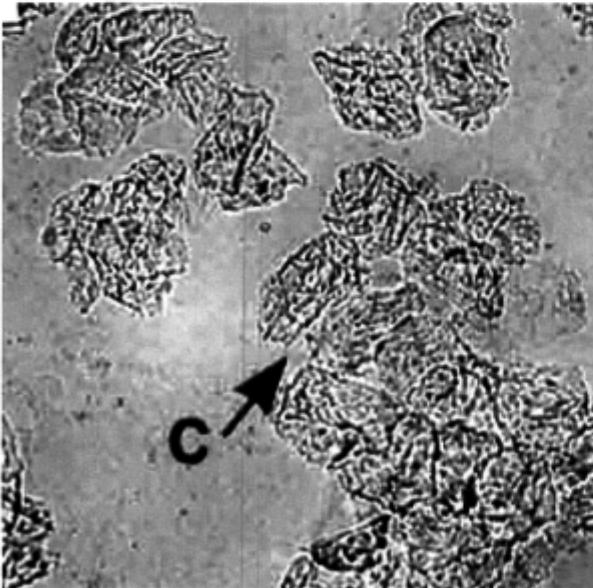
Xenogen, Discovery in the living organism, Living Image Software Version 2.50, California: Xenogen Corporation, 2004. 129p.

Annexes 1

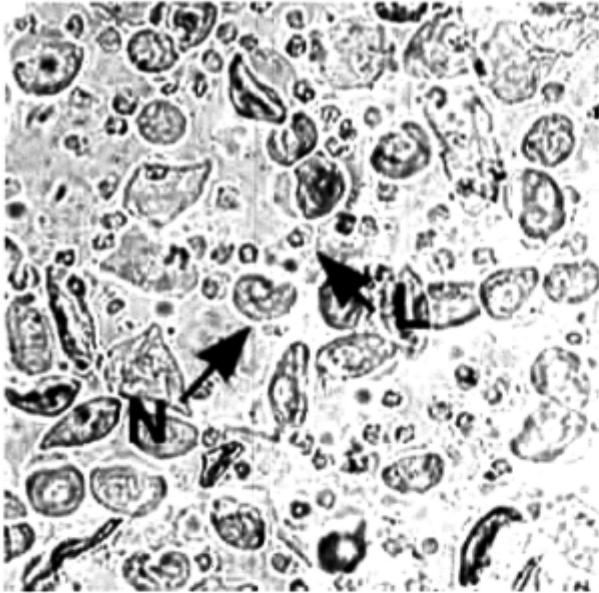
Interprétation des frottis vaginaux



Proestrus : Cellules épithéliales rondes et polynucléées (N).



Oestrus : Cellules épithéliales cornifiées (C).



Dioestrus : Lymphocytes (L) avec ou sans cellules épithéliales cornifiées.

Réaction de bioluminescence simplifiée et schématisée.



La schématisation complexe se trouve sous cette forme :

