



Université de Lille
Ecole Doctorale BIOLOGIE-SANTE
Laboratoire PRISM – U1192 Inserm

Implication de la signalisation ALK4/5 dans le dialogue entre les neurones et les cellules microgliales chez la sangsue *Hirudo medicinalis*

THESE DE DOCTORAT

Présentée et soutenue publiquement par

Antonella RAFFO ROMERO

Le 15 Janvier 2019

En vue de l'obtention du grade de Docteur en Biologie Cellulaire
De l'Université de Lille

Jury :

Rapporteurs

Dr. Elena AVIGNONE, Maître de conférences, Université de Bordeaux.

Dr. Amanda SIERRA, Professeur, Centre basque de neurosciences Achucarro (Espagne)

Examineurs

Dr. Vincent BEREZOWSKI, Professeur, Université de Lille-Université d'Artois. (Président du jury)

Dr. Christophe LEFEBVRE, Professeur, Directeur de thèse.

Dr. Michel SALZET, Professeur, Directeur du laboratoire, membre invité

*“A woman is like a tea bag, you never know
how strong she is until she gets in hot water.”*

- **Eleanor Roosevelt**

*Paciencia Dios te dé,
Que el saber de nada te vale.*

- **Juana Gonzales Cossini**

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier le Professeur Michel Salzet, directeur du laboratoire et le Professeur Isabelle Fournier, co-directrice du laboratoire, pour m'avoir donné l'opportunité de faire partie du laboratoire il y a déjà 5 ans. Merci d'avoir cru à la petite fille qui venait d'arriver du Pérou et qui cherchait un stage.

Je tiens à remercier mon Directeur de thèse le Professeur Christophe Lefebvre, toute d'abord pour m'avoir appris autant, pour m'avoir aidé tout au long de cette aventure avec ses conseils, ses réflexions, mais surtout pour avoir toujours su me motiver dans les moments compliqués, enfin ... plus pas faciles que compliqués.

Je remercie les Dr. Elena Avignone et Dr. Amanda Sierra, qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse. Je remercie également vivement le Pr. Vincent Bérézowski pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse, ainsi que tous mes CSI.

J'aimerais remercier Pierre-Eric et Jacopo pour tous les conseils et l'aide qu'ils m'ont apportés pendant ces 3 ans. De manière spéciale je veux remercier Tanina, Françoise, Christelle pour tous les moments partagés à disséquer, à réfléchir, à parler, à rigoler et pour tous les bons moments que vous m'avez donnés pendant ces 3 ans ainsi que pour votre aide et soutien.

Je veux remercier l'ensemble du laboratoire qui a fait de ces 3 ans, une partie de ma vie dont je me souviendrai toujours ! Julien, Maxence, Marie, Quentin, Mélanie, Khalil, Irène, Annie, Lauranne, Flore, Soulaïmane, Jean-Pascal, Franck, Lucie et à tous ceux que j'ai eu l'opportunité de connaître au laboratoire. Merci pour tous les bons moments. Merci d'avoir été plus des amis que des collègues.

Quiero agradecer a mi familia, Rosa, Marco, Giovanni, gracias por todo el apoyo que me dieron, por motivarme siempre y estar siempre presentes aunque estemos lejos. Gracias por repetirme siempre que puedo lograrlo todo. Gracias a mi Mama Juana por ser la persona más fuerte que conozco y siempre transmitirme un poco de esa fuerza. A mis abuelos Ernesto y Ela, que aunque ya no están conmigo siempre me guían y ayudan. A mi tío Francisco por todos sus sabios consejos. A mi tío Rafael, mi tía

Karina, mi tío Chamaco, mi tía Mónica, a mis primos Santiago y Facundo. A todo el resto de mi familia, que aunque somos muchos, nos mantenemos unidos y me ayudaron con sus consejos y motivación. A Paula por todos sus consejos y ayuda. A ma sœur adoptive Cécile et à Alex, merci pour être toujours là pour moi. Je veux remercier ma famille Christine, Ioëssa et François, merci de m'avoir encouragé et pour tous les bons moments, je suis contente de vous avoir avec moi. Y a todos mis amigos, especialmente a Alejandra S., Claudia, Alejandra, Philippe, Thibaux, Javi y Malena, por estar en las buenas, malas y peores.

Finalment je veux remercier Tristan, mon chéri, mon meilleur ami, mon soutien, mon sac de boxe, mon traducteur, mon allié dans le bon et le mauvais, mon tout ! Merci d'avoir été avec moi tout au long et jamais avoir baissé les bras, même au moment où je baissais les miens, je ne te remercierai jamais assez.

Je veux finalement remercier la belle coïncidence qui m'a amenée ici, au bon point, au bon moment, pendant cette période de ma vie, je vous remercie tous pour avoir été des personnes magnifiques et m'avoir rempli de bon moments.

PUBLICATIONS

A. Publications

1. Publications en soumission (3)

ALK4/5-dependent TGF- β signaling contributes to the crosstalk between neurons and microglia following axonal lesion.

Antonella Raffo-Romero^{1,2}, Tanina Arab^{1,2}, Christelle Van Camp, Quentin Lemaire^{1,2}, Maxence Wisztorski^{1,2}, Julien Franck^{1,2}, Soulimane Aboulouard^{1,2}, Françoise Le Marrec-Croq^{1,2}, Pierre-Eric Sautière^{1,2}, Jacopo Vizioli^{1,2}, Michel Salzet^{1,2} & Christophe Lefebvre^{*1,2}

1. Univ. Lille, Inserm, U-1192 - Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse-PRISM, F-59000 Lille, France
2. EURON – European Graduate School of Neuroscience, Maastricht, The Netherlands

Publication soumise à *Scientific Reports*.

Les activités neuronales sont sous l'influence des cellules gliales environnantes, notamment la microglie en tant que cellules immunitaires résidentes. Ces dialogues font intervenir les récepteurs du TGF- β . Ils ont été récemment décrits comme impliqués dans la maturation et la maintenance de la microglie mais aussi dans le développement des neurones. Les deux types de cellules peuvent être régulés par des ligands de type TGF- β et/ou GDF (facteurs de croissance et de différenciation). En utilisant le système nerveux de la sangsue médicinale, les sous-populations microgliales peuvent être étudiées lorsqu'elles interagissent avec des axones ou des corps cellulaires neuronaux. Les résultats ont montré que les neurones et la microglie utilisent tous deux ALK4/5 (un type de récepteurs TGF- β) permettant des échanges mutuels dans le cerveau adulte suite à une blessure axonale. Un GDF neuronal (nGDF) est immédiatement libéré par les axones lésés, ce qui contribue au recrutement précoce de la microglie ALK4/5⁺. De manière surprenante, dans les heures qui suivent, les corps cellulaires neuronaux ALK4/5⁺ sont également activés pour produire et libérer le facteur C1q impliqué dans une accumulation tardive de la microglie au niveau des axones lésés. Les résultats donnent un nouvel aperçu de la voie ALK4/5 en tant que signal important contribuant à une bonne mobilisation séquentielle dans le temps du recrutement des microglies conduisant à la régénération des axones.

Medicinal leech CNS as a model for exosome studies in the crosstalk between microglia and neurons

Antonella Raffo Romero^{*1}, Tanina Arab^{*1}, Issa S. Al-Amri², Françoise Le Marrec-Croq¹, Christelle Van Camp¹, Quentin Lemaire¹, Michel Salzet¹, Jacopo Vizioli¹, Pierre-Eric Sautière^{§1}, Christophe Lefebvre^{§1}

1. Univ. Lille, Inserm, U-1192 - Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse-PRISM, F-59000 Lille, France
2. University of Nizwa, DARIS Centre for Scientific Research, P.O. Box 33, PC616, Birkat Al-Mauz, Nizwa, Oman.

Publication soumise à *International Journal of Molecular Sciences*.

Dans un cerveau sain ou pathologique, l'état neuroinflammatoire est soutenu par une communication forte impliquant la microglie et les neurones. Des études récentes indiquent que les vésicules extracellulaires (VEs), comprenant les exosomes et les microvésicules, jouent un rôle clé dans les interactions physiologiques entre cellules permettant le développement et/ou l'intégrité du système nerveux central (SNC). Dans cette étude, nous avons utilisé le SNC de la sangsue médicinale pour étudier le dialogue entre microglie et neurones à partir d'approches *ex vivo* ainsi que des cultures primaires. Les résultats ont mis en évidence une importante production d'exosomes à partir de cellules microgliales activées. L'incubation de ces exosomes dans des cultures neuronales primaires a montré une forte interaction avec les neurites. En outre, les tests de croissance neuritique ont démontré que les exosomes de la microglie présentent des activités neurotrophiques significatives en utilisant au moins un membre de la famille du TGF- β , le nGDF. Il est intéressant de noter que les résultats ont également montré un dialogue entre les cellules microgliales de la sangsue et des cellules cibles de rat dépendant des VEs, soulignant que cette communication concerne davantage des molécules que des espèces. Cette étude apporte un nouvel éclairage sur le dialogue microglie/neurones dans le SNC et contribuerait à déchiffrer l'évolution moléculaire d'une telle communication cellulaire dans le cerveau.

La publication qui suit, représente le travail principal de Tanina Arab portant sur le développement de méthodes d'enrichissement des vésicules extracellulaires provenant de la microglie de sangsue. Nous avons déjà travaillé conjointement sur les préparations cellulaires, les analyses de croissance neuritique *in vitro*, ainsi que la caractérisation de certains constituants vésiculaires dans la publication précédente ci-dessus.

Proteomic characterization of leech microglia extracellular vesicles (EVs): comparison between differential ultracentrifugation and Optiprep™ density gradient isolation

Tanina Arab¹, Antonella Raffo Romero¹, Christelle Van Camp¹, Quentin Lemaire¹, Françoise Le Marrec-Croq¹, Soulaymane Aboulouard¹, Christian Slomianny^{2,3}, Anne-Sophie Lacoste³, Isabelle Guigon⁴, Hélène Touzet⁵, Michel Salzet¹, Isabelle Fournier¹, Christophe Lefebvre¹, Jacopo Vizioli*¹ and Pierre-Eric Sautière*¹

1. Univ. Lille, Inserm, U-1192 - Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse - PRISM, F-59000 Lille, France.
2. Univ. Lille, Inserm U1003, PHYCEL Laboratory, Physiologie Cellulaire, F-59000 Lille, France.
3. Univ. Lille, Bio Imaging Center Lille, F-59000 Lille, France.
4. Bilille and Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, UMR 9189 - CRISTAL - Centre de Recherche en Informatique Signal et Automatique de Lille, F-59000 Lille, France.
5. Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, Inria, UMR 9189 - CRISTAL - Centre de Recherche en Informatique Signal et Automatique de Lille, F-59000 Lille, France

La microglie chez la sangsue présente un schéma similaire d'activation et de migration lors d'une lésion expérimentale du système nerveux. Cette activation est associée à la libération d'une grande quantité de vésicules extracellulaires (VEs). Nous avons collecté les VEs libérées par les cellules microgliales placées en culture primaire et nous avons ensuite comparé deux protocoles d'enrichissement différents: l'un basé uniquement sur des ultracentrifugations différentielles et l'autre utilisant auparavant un gradient de densité Optiprep™. L'analyse des nanoparticules par comptage et microscopie électronique à transmission a permis d'évaluer leur taille et leur morphologie. Les contenus vésiculaires en protéines ont été évalués par des approches de spectrométrie de masse. Les résultats ont montré la présence de protéines spécifiques des VEs dans les deux procédures. L'analyse protéomique approfondie de chaque fraction ODG a confirmé l'efficacité de ce protocole pour limiter la présence d'agrégats protéiques co-isolés et d'autres particules membraneuses lors de l'isolement des vésicules. Cette étude a permis de caractériser pour la première fois les signatures protéiques provenant de VEs microgliales chez un organisme annélide. Fait intéressant, un grand nombre de protéines présentes dans les vésicules microgliales de sangsue correspond à des signatures vésiculaires déjà connues.

2. Contributions à d'autres études:

Les publications listées ci-dessous correspondent à mes contributions à d'autres sujets. Mon champ thématique concerne le dialogue entre cellules microgliales et neurones au cours de la réponse à une lésion. Dans un contexte similaire, d'autres études menées au laboratoire se sont intéressées à ces mécanismes chez le rat. Par mes compétences en microscopie confocale, j'y ai apporté une contribution ponctuelle (Mallah et al., Quanico et al., Delcourt et al.). L'étude des marquages par immunofluorescence et toutes les analyses de coupes par microscopie confocale m'a, de façon indirecte, appris beaucoup sur mon sujet. La structure du système nerveux du rat étant différente de celle de la sangsue, cela m'a permis d'avoir un regard comparatif et objectif sur mes propres conditions expérimentales de réponse à la lésion en termes de déplacements cellulaires et spécificités moléculaires.

Enfin, en assurant là encore les analyses confocales, j'ai pu également participer à l'étude de phénotypes macrophagiques dans un contexte, cette fois-ci, exclusivement tumoral (Rodet et al.).

2.1. Publication en soumission (1)

Systemic Biology Study of Mild-TBI Unveils the Role of Long Chain Acylcarnitines.

Khalil Mallah^{1,2}, Jusul Quanico¹, Antonella Raffo Romero¹, Tristan Cardon¹, Soulaymane Aboulouard¹, Firas Kobeissy³, Kazem Zibara², Michel Salzet^{1*}, Isabelle Fournier^{1*}

1. Université de Lille, INSERM, U1192 - Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), F-59000 Lille, France
2. ER045, PRASE, Laboratory of Stem Cells, Department of Biology, Faculty of Sciences-I, Lebanese University, Beirut, Lebanon
3. Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, American University of Beirut, Beirut, Lebanon

Publication soumise à *Neuron*.

Les dommages traumatiques du cerveau (TBI en anglais) représentent une cause importante de démence voire de décès. Dans une stratégie thérapeutique, la recherche de biomarqueurs a abouti à l'identification du marqueur GFAP comme indicateur global ou en dosage sérique. Cette étude a utilisé l'imagerie par spectrométrie de masse comme approche spatiotemporelle des tissus après traumatisme pour définir les signatures protéiques et lipidiques impliquées dans le microenvironnement de la lésion. Ceci a permis d'établir des cartes de marqueurs traumatiques au cours du temps et de montrer le rôle des acylcarnitines. Ainsi, la production microgliale d'acylcarnitines dans la substance noire 3 jours après la lésion et la surreprésentation de certaines protéines (GPR158, HGMB1, la synaptotagmine et glutamate décarboxylase) a permis de corrélérer les mécanismes de traumatisme modéré à ceux de la maladie de Parkinson.

2.2. Publication acceptées (3)

3D MALDI mass spectrometry imaging reveals specific localization of long-chain acylcarnitines within a 10-day time window of spinal cord injury.

Quanico J¹, Hauberg-Lotte L², Devaux S¹, Laouby Z¹, Meriaux C¹, Raffo Romero A¹, Rose M¹, Westerheide L², Vehmeyer J², Rodet F¹, Maass P², Cizkova D^{3,4}, Zilka N⁴, Cubinkova V⁴, Fournier I⁵, Salzet M⁶

1. Université de Lille, INSERM U1192 - Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), F-59000, Lille, France.
2. Center for Industrial Mathematics, University of Bremen, Bibliothekstraße 5, 28359, Bremen, Germany.

3. Department of Anatomy, Histology and Physiology, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice, Komenskeho 73, 041 81, Kosice, Slovakia.
4. Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Dubravska cesta 9, 845 10, Bratislava, Slovakia.
5. Université de Lille, INSERM U1192 - Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), F-59000, Lille, France. isabelle.fournier@univ-lille.fr.
6. Université de Lille, INSERM U1192 - Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), F-59000, Lille, France. michel.salzet@univ-lille.fr.

Sci Rep. 2018 Oct 31;8(1):16083.

<https://doi.org/10.1038/s41598-018-34518-0>

En utilisant l'imagerie par spectrométrie de masse 3D (MSI), cette étude décrit pour la première fois la détection et la localisation spécifique d'acylcarnitines à longue chaîne (ACL) le long des marges de lésion dans un modèle expérimental de lésion médullaire chez le rat (SCI). Les acylcarnitines palmitoylcarnitine (AC (16:0)), la palmitoléoylcarnitine (AC (16:1)), la carnitine élaïdique (AC (18:1)) et la tétradécanoylcarnitine (AC (14:1)) ont été détectées 3 jours après la blessure et étaient présents le long des marges de la lésion 7 et 10 jours après une lésion médullaire induite par la technique de compression par ballonnet chez le rat. La MSI a révélé la distribution hétérogène de ces lipides dans la moelle épinière lésée, apparaissant bien définie au niveau rostral de la lésion, au-dessus du centre de la lésion, et moins confinée aux marges de la région caudale. Les acylcarnitines co-localisent avec les microglies/macrophages résidents détectés le long des bords de la lésion par immunofluorescence. Étant donné le rôle pro-inflammatoire rapporté de ces acylcarnitines, leur localisation spatiale spécifique le long de la marge de la lésion pourrait laisser penser à leurs rôles physiopathologiques potentiels dans la progression de la lésion de la moelle épinière.

Spatially-Resolved Top-down Proteomics Bridged to MALDI MS Imaging Reveals the Molecular Physiome of Brain Regions.

Delcourt V^{1,2}, Franck J¹, Quanic J¹, Gimeno JP¹, Wisztorski M¹, Raffo-Romero A¹, Kobeissy F³, Roucou X², Salzet M⁴, Fournier I⁴.

1. From the ‡Laboratoire Proteomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM) - INSERM U1192, Université Lille 1, Bât SN3, 1 étage, Cité Scientifique, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.
2. Département de Biochimie Lab. Z8-2001, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada.
3. Department of Biochemistry and Molecular Genetics, Faculty of Medicine, American University of Beirut, Beirut, Lebanon.
4. From the Laboratoire Proteomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM) - INSERM U1192, Université Lille 1, Bât SN3, 1 étage, Cité Scientifique, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France; michel.salzet@univ-lille1.fr isabelle.fournier@univ-lille1.fr.

***Mol Cell Proteomics*. 2018 Feb;17(2):357-372.**

<https://doi.org/10.1074/mcp.M116.065755>

Une analyse protéomique à résolution spatiale dans les tissus a été réalisée sur 3 régions du cerveau, ce qui a permis de caractériser 123 protéines de référence. Dans ce contexte, 8 protéines alternatives, ce qui signifie qu'elles sont issues de différents cadres de lecture ouverts (AltORF) ont été identifiées. Certaines protéines présentent des profils de modification post-traductionnelle spécifiques ou une structure liée aux régions du cerveau et à leurs fonctions. L'analyse spatiale réalisée sur le protéome identifié dans chaque région a permis de corrélérer des mécanismes physiologiques fonctionnels à chaque région du cerveau. À titre d'exemple, la cartographie de la distribution du fragment C-terminal de l' α -synucléine (aa 95-140) a identifié sa distribution spécifique le long du gyrus denté de l'hippocampe. Cette étude a établi le physiome moléculaire de 3 régions cérébrales de rat à l'aide d'une caractérisation de référence et de protéomes cachés.

Deciphering molecular consequences of the proprotein convertase 1/3 inhibition in macrophages for application in anti-tumour immunotherapy.

Rodet F, Capuz A, Hara T, van Meel R, Duhamel M, Rose M, Raffo-Romero A, Fournier I, Salzet M

Inserm U-1192, Laboratoire de Protéomique, Réponse Inflammatoire, Spectrométrie de Masse (PRISM), Université Lille 1, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve D'Ascq, France.

***Journal of Biotechnology*, 2018 Sept. 20;(282):80-85**

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.002>

Au cours du développement tumoral, les macrophages sont recrutés sur le site tumoral et orientés vers un phénotype anti-inflammatoire. En raison de leur fonction immunosuppressive, les macrophages associés aux tumeurs (TAM) sont reconnus comme des composants majeurs de la progression tumorale. La transformation de ces macrophages en un phénotype pro-inflammatoire est donc largement étudiée en tant que moyen potentiel de développer une nouvelle thérapie anti-tumorale. Dans ce contexte, nous avons constaté que la proprotéine convertase 1/3 (PC1/3) est une cible pertinente. L'analyse protéomique révèle que les macrophages invalidés pour PC1/3 (KD) présentent toutes les caractéristiques des macrophages pro-inflammatoires activés. De plus, dans ces macrophages, les voies de signalisation TLR4 et TLR9 peuvent être renforcées conduisant à la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et anti-tumoraux. Pour développer une immunothérapie anti-tumorale efficace, nous pouvons (i) cibler les TAM directement à l'intérieur du site tumoral pour l'inhibition de PC1/3 et l'activation du TLR et les utiliser comme «macrophages de Troie» ou (ii) tirer directement parti des macrophages invalidés pour PC1/3 et les activer "à distance"

avec un ligand de TLR. Ces macrophages constituent donc une thérapie cellulaire innovante pour traiter efficacement les tumeurs.

B. Communications orales

Antonella Raffo Romero, Françoise Le Marrec-Croq, Christelle Van Camp, Jacopo Vizioli, Pierre-Eric Sautière, Michel Salzet and Christophe Lefebvre. **SINAPSIS (First Meeting of Peruvian Scientists in Europe) Paris 2016.** *Marcadores y fenotipo de las células microgliales en relación con la reparación neuronal. (Présentation)*

Antonella Raffo Romero, Françoise Le Marrec-Croq, Christelle Van Camp, Jacopo Vizioli, Pierre-Eric Sautière, Maxence Wisztorski, Michel Salzet and Christophe Lefebvre. **Club Jeune de la Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique 2017 (SFEAP).** *Protein signatures of microglia in the time course of their migration in order to define the dynamic study of the TGF- β response in *Hirudo medicinalis*. (Présentation)*

Antonella Raffo Romero, Françoise Le Marrec-Croq, Christelle Van Camp, Jacopo Vizioli, Pierre-Eric Sautière, Maxence Wisztorski, Michel Salzet and Christophe Lefebvre. **EURON PhD days, 25-26 Octobre 2017, Kerkrade, Pays-Bas.** *Study of the TGF- β signaling pathway in the crosstalk between microglial cells and neurons in leech CNS. (Présentation, Prix de la meilleure présentation)*

C. Posters

Antonella Raffo Romero, Françoise Le Marrec-Croq, Christelle Van Camp, Quentin Lemaire, Francesco Drago, Jacopo Vizioli, Pierre-Eric Sautière, Michel Salzet and Christophe Lefebvre. **EURON PhD meeting - Maastricht University 2015.** *Microglial phenotypes and markers related to neuronal repair in *Hirudo medicinalis*. (Poster)*

Antonella Raffo Romero, Françoise Le Marrec-Croq, Christelle Van Camp, Quentin Lemaire, Francesco Drago, Jacopo Vizioli, Pierre-Eric Sautière, Michel Salzet and Christophe Lefebvre. **6e Workshop du Club Français de NeuroImmunologie - Paris 2015.** *Microglial phenotypes and markers related to neuronal repair in *Hirudo medicinalis*. (Poster)*

Antonella Raffo Romero, Françoise Le Marrec-Croq, Christelle Van Camp, Jacopo Vizioli, Pierre-Eric Sautière, Michel Salzet and Christophe Lefebvre. **EURON PhD meeting - Université de Lille 1 2016.** *The early phase of microglial activation in leech CNS repair involves a TGF- β -dependent signaling. (Poster)*

Antonella Raffo Romero, Françoise Le Marrec-Croq, Christelle Van Camp, Jacopo Vizioli, Pierre-Eric Sautière, Maxence Wisztorski, Michel Salzet and Christophe Lefebvre. **SINAPSIS (Meeting of Peruvian Scientists in Europe) Berlin 2017**. *The early phase of microglial activation in leech CNS repair involves a TGF- β -dependent signaling. (Poster)*

Antonella Raffo Romero, Françoise Le Marrec-Croq, Christelle Van Camp, Jacopo Vizioli, Pierre-Eric Sautière, Maxence Wisztorski, Michel Salzet and Christophe Lefebvre. **21st Annual Meeting of the LARC-Neuroscience – Université de Lille 2017**. *Study of the TGF- β signaling pathway in the crosstalk between microglial cells and neurons in leech CNS. (Poster)*

Antonella Raffo Romero, Françoise Le Marrec-Croq, Christelle Van Camp, Jacopo Vizioli, Pierre-Eric Sautière, Maxence Wisztorski, Michel Salzet and Christophe Lefebvre. **SINAPSIS (Meeting of Peruvian Scientists in Europe) Barcelona 2018**. *The early phase of microglial activation in leech CNS repair involves a TGF- β -dependent signaling. (Poster)*

D. Organisation de congrès

Comité Organisateur : **SINAPSIS (Meeting of Peruvian Scientists in Europe) Barcelona 2018**.

Comité Organisateur : **SINAPSIS (Meeting of Peruvian Scientists in Europe) Berlin 2017**.

Comité d'organisation local: **EURON PhD meeting – Université de Lille 1 2016**.

E. Encadrement d'étudiants

Yngrid Vanessa Delgado Castillo (**Master I** - 2 mois)

Marcello Devincenzi (**Master II** – 6 mois)

RESUME

Implication de la signalisation ALK4/5 dans le dialogue entre les neurones et les cellules microgliales chez la sangsue *Hirudo medicinalis*

Dans le système nerveux central (SNC), toutes les activités neuronales sont sous l'influence des cellules gliales environnantes, incluant notamment les cellules microgliales. Ces cellules immunitaires résidentes du SNC régulent l'état neuroinflammatoire, si important dans les maladies neurodégénératives. Dans la microglie, les récepteurs du TGF- β de type I (ALK5) et de type II ont récemment été décrits comme une signature spécifique par rapport aux macrophages méningés ou infiltrants depuis le sang, permettant la maintenance/maturation de la microglie. Ces récepteurs sont également utilisés par les neurones en développement sous l'influence de membres de la famille TGF- β , incluant plusieurs GDFs (facteurs de croissance et de différenciation).

C'est pourquoi, cette signalisation ALK4/5 a été étudiée dans le dialogue entre cellules microgliales et neurones chez la sangsue *H. medicinalis*. La sangsue médicinale est un modèle de neurobiologie qui, par sa structure nerveuse intéressante, offre la possibilité d'étudier les interactions entre sous-populations microgliales et neurones.

Les résultats ont montré que les neurones et la microglie utilisent tous les deux la signalisation ALK4/5 dépendamment d'un membre de la famille TGF- β , appelé nGDF, pour maintenir des échanges mutuels après une lésion axonale. En effet, une libération neuronale immédiate de nGDF après une blessure axonale permet le recrutement précoce de microglie ALK4/5⁺ au point de la lésion tandis que, plus tardivement, la production de nGDF dans des cellules microgliales active de façon paracrine les neurones ALK4/5⁺. Ce second temps de dialogue permet aux neurones d'induire la production d'autres signaux chimiotactiques et ainsi maintenir l'accumulation de la microglie.

Dans leur ensemble, les résultats permettent un nouvel aperçu de la compréhension de la voie ALK4/5 en tant que signal régulateur guidant une mobilisation chronologique correcte du recrutement de la microglie dans un cerveau adulte capable de régénération axonale. Les résultats ouvrent la perspective d'une telle étude chez les

mammifères adultes afin de préciser la pertinence de ce dialogue dans le cerveau soumis à des lésions accidentelles ou pathologiques.

Mots clés: Dialogue Microglie-Neurones ; Signalisation TGF- β ; Sangsue *Hirudo Medicinalis*; Régénération axonale ; Neuro-Protéomique.

SUMMARY

Involvement of ALK4/5 signaling in the crosstalk between neurons and microglial cells in the leech *Hirudo medicinalis*

In the central nervous system (CNS), all neuronal activities are under the influence of surrounding glial cells, including microglial cells. These resident CNS immune cells regulate the neuroinflammatory state, so important in neurodegenerative diseases. In microglia, TGF- β type I (ALK5) and type II receptors have recently been described as a specific signature compared to meningeal or infiltrating macrophages from the blood, allowing maintenance/maturation of microglia. These receptors are also used by developing neurons under the influence of members of the TGF- β family, including several GDFs (growth and differentiation factors).

Therefore, this ALK4/5 signaling was studied in the crosstalk between microglial cells and neurons in the *H. medicinalis* leech. The medicinal leech is a model of neurobiology that, through its interesting nervous structure, offers the possibility of studying the interactions between microglial subpopulations and neurons.

The results showed that both neurons and microglia use ALK4/5 signaling, depending on a member of the TGF- β family, called nGDF, to maintain mutual exchanges after axonal injury. Indeed, immediate neuronal release of nGDF after axonal injury allows early recruitment of ALK4/5⁺ microglia at the point of injury while, later, production of nGDF in microglial cells paracrine-activated ALK4/5⁺ neurons. This second crosstalk time allows the neurons to induce the production of other chemotactic signals and thus maintain the accumulation of microglia.

Together, the results provide a new insight into the understanding of the ALK4/5 pathway as a regulatory signal guiding correct timing of recruitment of microglia in an adult brain capable of axonal regeneration. The results open up the prospect of such a study in adult mammals to clarify the relevance of this dialogue in the brain subjected to accidental or pathological lesions.

Keywords: Crosstalk Microglia-Neurons; TGF- β signaling; Leech *Hirudo Medicinalis*; Axonal regeneration; Neuro-Proteomics.

SOMMAIRE

| | |
|--|-------|
| REMERCIEMENTS..... | I |
| PUBLICATIONS | III |
| A. Publications | III |
| 1. Publications en soumission (3) | III |
| 2. Contributions à d'autres études:..... | V |
| 2.1. Publication en soumission (1)..... | VI |
| 2.2. Publication acceptées (3) | VI |
| B. Communications orales | IX |
| C. Posters | IX |
| D. Organisation de congrès..... | X |
| E. Encadrement d'étudiants | X |
| RESUME | XI |
| SUMMARY | XIII |
| SOMMAIRE | XIV |
| LISTE DES FIGURES..... | XVIII |
| LISTE DES TABLEAUX..... | XXII |
| LISTE DES ABREVIATIONS | XXIII |
| AVANT-PROPOS | 1 |
| INTRODUCTION | 5 |
| A. La structure du Système nerveux des mammifères :..... | 6 |
| 3. Moelle épinière..... | 7 |
| 4. Le cerveau..... | 7 |
| B. Les cellules du système nerveux central : | 8 |
| 1. Les neurones..... | 8 |
| 1.1. Classification structurale des neurones | 10 |
| 2. Cellules gliales..... | 11 |
| 2.1. Les astrocytes | 11 |
| 2.2. Les oligodendrocytes..... | 14 |
| 2.2.1. La Myélinisation | 15 |
| 2.3. La microglie..... | 16 |
| 2.3.1. Caractéristiques..... | 16 |
| 2.3.2. Origine | 17 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.3.3. | Maturation des cellules microgliales | 21 |
| 2.3.4. | Renouvellement | 22 |
| 2.3.5. | Marqueurs microgliaux | 23 |
| 2.3.6. | Les différents états de la microglie | 25 |
| | Les multiples phénotypes microgliaux | 27 |
| 2.3.7. | Les fonctions microgliales | 28 |
| 2.3.7.1. | Le rôle central de la microglie en tant que phagocytes | 28 |
| 2.3.7.2. | « Synaptic pruning » ou Elagage synaptique | 30 |
| 3. | Les macrophages du SNC..... | 33 |
| C. | La sangsue <i>Hirudo medicinalis</i> | 35 |
| 1. | Le système nerveux central chez la sangsue..... | 36 |
| 1.1. | Cellules microgliales | 39 |
| 1.2. | Recrutement de cellules microgliales..... | 41 |
| 1.3. | Dialogue entre microglie et neurones après une lésion | 45 |
| D. | Voie de la signalisation de la famille TGF- β | 46 |
| E. | Dialogue médié par des vésicules extracellulaires..... | 51 |
| | MATERIELS ET METHODES | 56 |
| 1. | Matériels biologiques | 57 |
| 1.1. | Dissection du système nerveux central de sangsue..... | 57 |
| 1.2. | Préparation du SNC | 57 |
| 1.3. | Préparation des cultures primaires | 58 |
| 1.4. | Milieu conditionné (MC) de sangsue pour les expériences de chimiotactisme | 58 |
| 2. | Protocoles généraux..... | 59 |
| 2.1. | Extraction d'ARN totaux | 59 |
| 2.2. | Synthèse des ADN complémentaires | 60 |
| 2.3. | PCR semi-quantitative (PCR) | 60 |
| 2.4. | Insertion dans le vecteur PGEM-T easy et Transformation des bactéries JM109 | 61 |
| 2.5. | Extraction plasmidique | 61 |
| 2.6. | Extraction de protéines totales | 62 |
| 3. | Exploitation de banques de données | 62 |
| 4. | Caractérisation moléculaire par SMARTer® RACE 5'/3' | 63 |
| 4.1. | SMARTer® RACE 5'/3' | 63 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.2. | Préparation d'ADNc pour la RACE 3 'et 5' | 63 |
| 4.3. | Nested PCR | 64 |
| 5. | Analyse de l'expression génique | 65 |
| 5.1. | Q-PCR..... | 65 |
| 6. | Hybridation in situ par fluorescence (FISH)..... | 67 |
| 6.1. | Préparation des ribosondes..... | 67 |
| 6.1.1. | Purification | 67 |
| 6.1.2. | Ligation et transformation des bactéries..... | 67 |
| 6.1.3. | Linéarisation..... | 67 |
| 6.1.4. | Transcription in vitro..... | 68 |
| 6.2. | Protocole d'hybridation in situ dans le SNC de sangsue | 68 |
| 7. | Etude du recrutement des cellules microgliales de sangsue | 70 |
| 7.1. | Tests de chimiotactisme | 70 |
| 7.2. | Tests de recrutement de cellules microgliales ex vivo | 71 |
| 8. | Immunohistochimie..... | 71 |
| 9. | Western-Blot | 73 |
| 9.1. | L'électrophorèse–SDS PAGE..... | 73 |
| 9.2. | Transfert sur membrane..... | 74 |
| 9.3. | ImmunoBlot..... | 74 |
| 10. | Etudes protéomiques | 74 |
| 10.1. | Banque de données protéomiques | 74 |
| 10.2. | Préparation des échantillons..... | 75 |
| 10.2.1. | Etude protéomique à la lésion..... | 75 |
| 10.2.2. | Etude protéomique des sous-populations microgliales (ganglions vs. connectifs) | 76 |
| 10.3. | Digestion en gel | 76 |
| 10.4. | Nano LC-HR-MS/MS..... | 77 |
| 10.5. | Analyses de données | 78 |
| 11. | Etude du dialogue médié par des vésicules : | 79 |
| 11.1. | Enrichissement des Vésicules Extracellulaires (VEs) | 79 |
| 11.2. | Croissance neuritique | 80 |
| | ANALYSE PROSPECTIVE ET OBJECTIFS DE THESE..... | 81 |
| | RESULTATS..... | 87 |

| | |
|--|-----|
| 1. Etude du dialogue dépendant du récepteur de type 1 au TGF- β (ALK4/5) chez la sangsue | 88 |
| 1.1. Caractérisation d'un récepteur de type 1 au TGF- β | 88 |
| 1.2. Localisation de l'ARNm dans le SNC chez la sangsue | 92 |
| 1.3. Localisation protéique du récepteur ALK4/5 dans le SNC..... | 93 |
| 1.4. ALK4/5 est impliqué dans le chimiotactisme de la microglie..... | 94 |
| 1.5. Caractérisation du nGDF, ligand du récepteur ALK4/5 | 95 |
| 2. Fonctions du nGDF dans la réponse à la lésion axonale | 99 |
| 2.1. Le nGDF neuronal est pleinement impliqué dans le recrutement de la microglie a la lésion | 99 |
| 2.2. Les cellules microgliales ALK4/5 ⁺ contribuent à la phase précoce du recrutement..... | 102 |
| 2.3. Les neurones ALK4/5 ⁺ interviennent dans la phase tardive du recrutement de la microglie | 105 |
| 2.4. Les cellules microgliales activent les neurones ALK4/5 ⁺ pour la production de HmC1q | 109 |
| 2.5. Les microglies ganglionnaires activées produisent également nGDF pour influencer les neurones | 111 |
| 3. Etude de la signature protéomique chez la sangsue: | 115 |
| 3.1. Etude de la signature protéomique aux lésions ALK4/5 dépendant :.. | 115 |
| 3.2. Étude préliminaire des signatures protéomiques des cellules microgliales issues des ganglions nerveux vs. des connectifs..... | 123 |
| 4. Etude du dialogue entre cellules microgliales et neurones médié par des vésicules nGDF ⁺ | 124 |
| 5. Résultats préliminaires sur la caractérisation de la Voie de signalisation ALK4/5 | 132 |
| DISCUSSION ET CONCLUSION..... | 136 |
| BIBLIOGRAPHIE | 157 |
| ANNEXES..... | 179 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1: Les cellules du système nerveux central.. | 8 |
| Figure 2: Classement des neurones en utilisant des critères morphologiques, physiologiques et moléculaires. | 10 |
| Figure 3: Relations cyto-architecturales des astrocytes. | 12 |
| Figure 4 : Origine des cellules microgliales. | 19 |
| Figure 5 : Les trois étapes successives de la phagocytose dans les cellules microgliales.. | 28 |
| Figure 6: Régulation des réseaux neuronaux et des fonctions par la microglie. | 30 |
| Figure 7: Disfonctionnement de cellules microgliales dans leur rôle vers les neurones.. | 32 |
| Figure 8: Origine et localisation de cellules microgliales et des macrophages du SNC. | 33 |
| Figure 9: Schéma du système nerveux central chez <i>Hirudo medicinalis</i> .. | 37 |
| Figure 10: Prélèvement du SNC chez la sangsue. | 38 |
| Figure 11: Immunodétection du marqueur microglial Iba1 dans des fragments de SNC. | 39 |
| Figure 12: Immunodétection de la microglie par la gliarine dans des fragments de SNC. | 40 |
| Figure 13: Observation de l'accumulation des cellules microgliales à partir d'un segment de connectifs après lésion. | 41 |
| Figure 14: Représentation schématique de la maturation du TGF- β . | 47 |
| Figure 15 : Mécanisme fondamental de la voie canonique de la superfamille de TGF- β . V | 49 |
| Figure 16: Représentation schématique des vésicules extracellulaires. | 52 |
| Figure 17: Rôles postulés des microvésicules dans la communication dans le SNC. | 54 |
| Figure 18 : Hybridation in situ de TGF- β R1, Légumine et HexB dans des fragments de SNC. | 84 |
| Figure 19: Caractérisation de la séquence en nucléotides et en acides aminés du récepteur ALK4/5, récepteur de type 1 au TGF- β chez la sangsue. | 89 |
| Figure 20: Caractérisation bio-informatique de ALK4/5 un récepteur de type I au TGF- β . | 91 |
| Figure 21: Hybridation in situ par fluorescence d'ALK4/5 dans des fragments de SNC. | 92 |

| | |
|---|-----|
| Figure 22: Analyse par microscopie confocale de l'immunofluorescence ALK4/5 dans des fragments de SNC..... | 94 |
| Figure 23: Effet chimiotactique du TGF- β humain recombinant sur les cellules microgliales..... | 95 |
| Figure 24: Caractérisation moléculaire du nGDF (membre de la famille TGF- β) dans la sangsue..... | 97 |
| Figure 25: Séquence protéique du nGDF et alignement de la séquence de sangsue comparé avec GDF8 et GDF11..... | 98 |
| Figure 26 : Immunodétection du nGDF par western blot et par marquage fluorescence dans des fragments de SNC..... | 99 |
| Figure 27 : Résultats de RT-qPCR montrant le niveau relatif de transcrit ngdf dans les neurones..... | 100 |
| Figure 28: Effet chimiotactique du milieu conditionné de neurones ou de cellules microgliales, sur des cellules microgliales..... | 101 |
| Figure 29 : Expériences ex vivo de recrutement de la microglie au cours du temps et dépendamment d'ALK4/5 | 103 |
| Figure 30 : Analyse en microscopie confocale de l'immunofluorescence ALK4/5 dans des fragments de SNC..... | 105 |
| Figure 31: Influence des TGF- β recombinant humain sur la croissance neuritique in vitro..... | 107 |
| Figure 32 : Etude du niveau relatif de transcrit hmc1q par RT-qPCR dans les cultures primaires des neurones..... | 108 |
| Figure 33: Images en microscopie confocale de l'immunofluorescence gC1qR ⁺ dans des fragments de SNC..... | 109 |
| Figure 34 : Analyse par RT-qPCR du niveau d'ARNm hmc1q dans les cultures primaires des neurones..... | 110 |
| Figure 35: Analyse par Western blot de nGDF sur d'extraits protéiques de neurones et de cellules microgliales..... | 111 |
| Figure 36 : Analyse par hybridation in situ de l'ARNm ngdf dans les ganglions nerveux sur des fragments de SNC..... | 112 |
| Figure 37: Analyse par microscopie confocale de l'immunofluorescence de nGDF dans les ganglions nerveux sur des fragments de SNC..... | 113 |
| Figure 38 : Analyse préliminaire par RT-qPCR des niveaux d'ARNm d'emapii et hmil-16 dans la culture primaire des neurones..... | 114 |

| | |
|---|-----|
| Figure 39 : Protocole expérimental utilisé pour l'analyse protéomique ex vivo de la lésion du SNC de la sangsue. | 116 |
| Figure 40 : Diagramme de Venn des signatures de protéines dans SB431542- vs. véhicule, temps par temps. | 117 |
| Figure 41: Analyse chronologique des signatures de protéines dans SB431542 vs. véhicule..... | 118 |
| Figure 42 : Analyse des signatures de protéines dans SB431542 vs. véhicule, temps par temps..... | 119 |
| Figure 43 : Analyse par le logiciel Funrich des voies biologiques..... | 120 |
| Figure 44 : Analyse par le logiciel Funrich des component cellulaires, exosomes et réseaux des protéines exosomales à T6h post-lésion véhicule.. . . . | 122 |
| Figure 45 : Heatmap des analyses protéomiques de cellules microgliales ganglionnaires et celles des connectifs..... | 124 |
| Figure 46 : Co-culture primaire de cellules microgliales et neurones..... | 125 |
| Figure 47: Microscopie électronique à transmission (MET) des vésicules extracellulaires de cellules microgliales chez la sangsue..... | 126 |
| Figure 48: Analyses par immunofluorescence avec un anticorps monoclonal de souris anti-gliarine de sangsue sur des cultures de cellules nerveuses de sangsue..... | 127 |
| Figure 49: Influence des VEs microgliales sur la croissance neuritique in vitro..... | 128 |
| Figure 50: Analyse par microscopie confocale de l'immunofluorescence du nGDF après la lésion des connectifs, à l'aide d'anticorps polyclonaux de lapin anti-TGF- β humain.. . . . | 129 |
| Figure 51 : Analyse par Western blot d'extraits de protéines issus de vésicules extracellulaires d'origine microgliales ou de cellules microgliales et double immunomarquage en utilisant des anticorps anti-TGF- β 1 et anti-Alix..... | 130 |
| Figure 52: Influence des VEs microgliales sur la croissance neuritique in vitro dans un contexte dépendant d'ALK4/5..... | 131 |
| Figure 53: Caractérisation bio-informatique de récepteur de type IIB a l'activine et de SMAD2/3..... | 133 |
| Figure 54: Analyse par microscopie confocale de co-marquage ALK5 et ACTRIIB obtenue sur des cultures primaires de neurones. | 134 |
| Figure 55: Analyse par microscopie confocale du marquage SMAD2/3 obtenue sur des cultures primaires de neurones.. . . . | 134 |
| Figure 56: Alignement multiple avec TGF- β 1/2/3.. . . . | 179 |

| | |
|--|-----|
| Figure 57: Alignement multiple du ligand nGDF chez la sangsue avec Activine A et B. | 180 |
| Figure 58: Alignement multiple du ligand nGDF chez la sangsue avec Nodal. | 181 |
| Figure 59: Alignement multiple avec GDF 1/3/5. | 182 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|-----|
| Tableau 1: Résultat de l'interrogation des banques de données (pour des raisons de fluidité dans la lecture des abréviations, les noms entiers ont été maintenus en anglais) | 83 |
| Tableau 2: Liste des protéines exclusives représentées dans les diagrammes de Venn | 183 |
| Tableau 3 : Liste des protéines surexprimées identifiées dans des clusters spécifiques. | 185 |
| Tableau 4 : Liste des protéines exclusives représentées dans les diagrammes de Venn. | 187 |
| Tableau 5 : Liste des protéines surreprésentées de Heatmaps. | 189 |
| Tableau 6 : Liste des protéines associées à la voie exosomale.. | 190 |
| Tableau 7 : Liste des protéines surreprésentées de Heatmaps.. | 192 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|--------|---|
| ALK | Activin Like Kinase |
| AMH | Anti-Mullerian Hormone |
| BDNF | Brain-Derived Neurotrophic Factor |
| BHE | Barrière Hémato-Encéphalique |
| BMPs | Bone Morphogenic Proteins |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| C1q/C3 | Composant du complément |
| CD | Cell surface glycoprotein CD |
| CHM | Complexe Majeur d'Histocompatibilité |
| CPA | Cellules Présentatrices d'Antigènes |
| CPO | Cellules Précurseurs d'Oligodendrocytes |
| CSF1 | Colony stimulating factor 1 |
| CSF1R | Colony stimulating factor 1 receptor |
| CX3Cl1 | Fractalkine |
| CX3CR1 | Récepteur de la chémokine CX3Cl1 |
| CXCR4 | Récepteur membranaire de la protéine CXCL12 |
| DAPI | 4', 6'-DiAmino-2-PhénylIndole |
| DMSO | Diméthylsulfoxyde |
| DTT | Dithiothréitol |
| EAE | Encéphalomyélite Allergique Expérimentale |
| F4/80 | Factor Transcription F4/80 |
| FCRLS | Fc receptor-like 5, scavenger receptor |
| GDFs | Growth Differentiation Factors |
| GDNF | Glia-Derived Neurotrophic Growth Factor |
| GFAP | Glio Fibrillaire Acid Protein |
| HEXB | Beta-hexosaminidase subunit beta |
| IGF-1 | Insulin like Growth Factor |
| IL | Interleukine |
| iNOS | Inducible Nitric Oxide Synthase |
| IRF | Interferon Regulatory Factor |
| LCR | Liquide Céphalo Rachidien |
| LESA | Micro-extraction liquide de surface |

| | |
|----------|---|
| LFQ | Label free quantification |
| MAP 2 | Microtubule Associated Protein 2 |
| M-CSF | Macrophage Colony Stimulating Factor |
| MM | Macrophages méningés |
| MPCs | Macrophages des plexus choroïdes |
| MPV | Macrophages périvasculaires |
| NeuN | Neuronal Nuclear Antigen |
| NO | Monoxyde d'azote |
| NRROS | Transforming growth factor beta activator LRRC33 |
| NSE | Énolase spécifique des neurones |
| P2ry12 | Purinergic 2Y12 Receptor |
| PAF | Paraformaldéhyde |
| PBS | Phosphate Buffer Saline |
| PEMs | Précurseurs érythromyéloïdes |
| PP2A | Sérine/thréonine protéine phosphatase 2A |
| PU.1 | PU-box binding transcription factor 1 |
| Q-PCR | Quantitative – Polymerase Chain Reaction |
| RT-PCR | Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction |
| SALL1 | Sal-like protein 1 |
| SNC | Système Nerveux Central |
| TGF-β | Transforming Growth Factor – Beta |
| TGF-β R1 | Transforming Growth Factor – Beta receptor type-1 |
| TLR | Toll Like Receptor |
| TMEM119 | Transmembrane protein 119 |
| VEs | Vésicules Extracellulaires (EVs in english) |

AVANT-PROPOS

De nombreuses activités du système nerveux central (SNC) sont corrélées à l'état neuro-inflammatoire. C'est un mécanisme complexe qui est de plus en plus considéré mais encore mal compris car les processus immunitaires sont divers et dépendants de l'environnement cellulaire. Cette neuro-inflammation peut être affectée par l'infiltration de cellules du système immunitaire en fonction de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. L'inflammation basale est très bien médiée par le SNC, elle est même une étape immunitaire nécessaire pour sa protection. En revanche, la perte de son contrôle par la présence d'agents infectieux externes ou d'éléments endogènes entraîne une neuroinflammation inappropriée, cruciale dans les maladies neurodégénératives (Lucas, Rothwell, & Gibson, 2009; Raivich et al., 1999). Ce lien entre inflammation et neurodégénérescence est donc loin d'être élucidé à tel point que l'on ne sait pas lequel des deux en est la cause ou la conséquence (Peterson & Fujinami, 2007).

Cette neuroinflammation est régulée grâce au dialogue entre les cellules immunitaires et d'autres types cellulaires du SNC (neurones et cellules gliales dérivées de neurones: astrocytes et oligodendrocytes). Ces cellules immunitaires résidant dans le cerveau, les cellules microgliales, ont été décrites pour la première fois par del Rio-Hortega dans les années 1920-1930. En condition physiologique, elles ont un statut d'immunosurveillance garantissant l'homéostasie du SNC. En cas de signaux d'activation, la microglie change de morphologie (étoilée à l'état basal) pour adopter une conformation amiboïde sans filopodes (Kettenmann, Hanisch, Noda, & Verkhratsky, 2011). Ces cellules sentinelles sont très importantes et constituent une première ligne de réponse immunitaire aux blessures ou aux processus inflammatoires. Elles interagissent fortement avec d'autres cellules cérébrales régulant les circuits neuronaux et la transmission synaptique (Li & Barres, 2017; Prinz, Erny, & Hagemeyer, 2017). En effet, les cellules microgliales sont actuellement perçues chez les mammifères comme les cellules orchestrant l'état inflammatoire (Sankowski, Mader, & Valdés-Ferrer, 2015). Il est important de noter que plusieurs études récentes ont démontré que les cellules immunitaires résidentes du cerveau, par leur réactivité

aux changements micro-environnementaux, peuvent à la fois déclencher et/ou subir la régulation des événements inflammatoires associés aux maladies neurodégénératives (Sankowski et al., 2015). En fait, la compréhension des cellules microgliales est restée longtemps déformée par une vision locale et phénotypique de leur réponse. Il n'existe plus aujourd'hui l'idée de « bonne » (ou neuroprotectrice) ou « mauvaise » (ou neurotoxique) microglie. Constituées de sous-populations caractérisées par des maturité, réactivité et environnement cellulaire propres, leurs réponses sont très variables. Elles peuvent en fait agir comme les deux faces d'une même pièce et devraient être perçues dans toute leur complexité (Aguzzi, Barres, & Bennett, 2013). Comme si cela ne suffisait pas, des études récentes montrent qu'il existe une influence du sexe et du microbiote sur les cellules microgliales, suggérant que les réponses obéissent à un programme à la fois développemental mais aussi lié à notre environnement et notre hygiène de vie (Erny et al., 2015; Matcovitch-Natan et al., 2016; Rahimian, Cordeau, & Kriz, 2018; Thion et al., 2018).

Enfin, les microglies et les macrophages sont des cellules myéloïdes issues respectivement de l'hématopoïèse primitive et définitive (Ginhoux et al., 2010). De ce fait, en cas d'infiltration de macrophages due à l'ouverture de la barrière hématoencéphalique lors de lésions, la discrimination *in vivo* des fonctions microgliales et macrophagiques est nécessaire mais reste difficile (Goldmann et al., 2016; Prinz et al., 2017). Comme décrit récemment, les fonctions microgliales dépendent de signaux externes et locaux. Des environnements tissulaires distincts activent respectivement des programmes génétiques différentiels et des phénotypes spécifiques pour les macrophages et les microglies (Gosselin et al., 2014; Lavin et al., 2014). Cette notion ne peut être ignorée pour la bonne compréhension de l'état neuro-inflammatoire dans les pathologies du SNC.

Pour cela, de nouveaux outils pour étudier spécifiquement la fonction des cellules microgliales, distinctivement des macrophages, sont maintenant essentiels pour fournir de nouvelles informations sur la neuroinflammation et la pathogenèse (Aguzzi et al., 2013). C'est dans ce contexte que mon laboratoire utilise un modèle d'étude complémentaire : la sangsue *Hirudo medicinalis*. Sans prétendre établir un parallèle naturel et complet avec les réponses microgliales déclenchées chez les mammifères,

cet organisme développe des échanges entre microglie et neurones qui sont adaptés à des situations de lésions neuronales spécifiques. En effet, Pio del Rio-Hortega a notamment utilisé le SNC de la sangsue pour décrire historiquement la microglie en utilisant une coloration au carbonate d'argent. Ce modèle alternatif a la capacité de réparer fonctionnellement ses lésions axonales et restaurer des connexions synaptiques identiques à celles d'avant lésion (Baylor & Nicholls, 1971a). Dans ce contexte, les cellules microgliales ont été suivies grâce à leur marquage positif pour *iba1*, un marqueur de cellule myéloïde largement utilisé chez les modèles mammifères pour étudier la microglie résidente (Drago et al., 2014; Le Marrec-Croq, Drago, Vizioli, Sautière, & Lefebvre, 2013). De plus, les cellules microgliales sont les uniques cellules capables de répondre à des molécules chimiotactiques et migrer jusqu'au point de la lésion (Croq et al., 2010; Le Marrec-Croq et al., 2014; Schikorski et al., 2009; Tahtouh et al., 2009, 2012). Il a été démontré qu'un rapprochement périphérique de cellules sanguines participerait à la formation de cicatrices gliales autour des cellules endothéliales (Boidin-Wichlacz et al., 2012), tandis que la microglie interne au SNC favoriserait directement un processus de régénération (Tasiemski & Salzet, 2017). De ce fait, la sangsue représente un modèle intéressant pour mieux comprendre les réponses microgliales.

De façon intéressante, la chaîne nerveuse de la sangsue médicinale présente un avantage structural. Les corps cellulaires neuronaux sont en effet concentrés dans les ganglions nerveux et projettent leurs axones dans les tissus inter-ganglionnaires appelés tissus connectifs. Ceci nous permet de réaliser des lésions expérimentales des tissus connectifs afin de pincer uniquement les axones sans toucher les corps cellulaires neuronaux. Ainsi, les mécanismes de repousse axonale suivis de reconnexion synaptique peuvent être étudiés très localement dans la zone de lésion sans compromettre la survie neuronale. Par conséquent, au-delà d'une bonne connaissance de sa structure, le système nerveux d'*Hirudo medicinalis* peut être considéré comme un modèle d'intérêt pour l'étude de la compréhension du dialogue qui existe entre neurones et cellules microgliales, dépendamment du microenvironnement.

Comme ce dialogue entre neurones et microglies repose sur des signalisations très nombreuses, notre étude s'est concentrée sur la compréhension de l'une d'elle en particulier : la signalisation de la famille TGF- β . Cependant, ce choix est loin d'être un choix aléatoire. En 2014, la signalisation du TGF- β a été démontrée comme essentielle dans le développement et le maintien de la population microgliale (Butovsky et al., 2014; Gosselin et al., 2014). En particulier, une expression élevée des ARNm *tgfbr1* et *tgfbr2*, codant respectivement pour les récepteurs du TGF- β de type I (alias récepteur de la kinase 5 ou ALK5) et de type II, a été décrite comme spécifique de la microglie résidente par rapport aux macrophages méningés et à ceux provenant d'une infiltration sanguine.

En utilisant le SNC de sangsue, et après avoir identifié ces molécules, je me suis intéressée à l'étude de l'implication d'un membre de la famille TGF- β . Nous avons privilégié un contexte de lésion axonale réalisée dans les tissus connectifs. Compte tenu du fait que les cellules microgliales sont essentielles à la préservation d'une régénérescence axonale naturelle chez cet organisme, il devient possible de déchiffrer l'implication de cette signalisation TGF- β dans un environnement neuroprotecteur.

INTRODUCTION

Avant de décrire précisément le modèle d'étude que nous avons utilisé, il semble nécessaire de rappeler les bases cellulaires et les caractéristiques structurales du système nerveux chez les mammifères. Il est en effet, de mon point de vue, essentiel de comprendre les fondements des échanges cellulaires afin de mieux percevoir les similitudes et les différences avec le modèle sangsue. Une attention particulière sera tout naturellement accordée à la description de la microglie. Cette mise en résonance des caractéristiques morphologiques et moléculaires aura pour objectif de souligner l'intérêt que pourrait susciter ce travail dans une vision translationnelle.

A. La structure du Système nerveux des mammifères :

De manière générale, le système nerveux est composé de deux parties, le système nerveux périphérique (SNP), composé de nerfs spinaux répartis dans tout le corps, et le système nerveux central (SNC), composé par le cerveau et la moelle épinière. Le cerveau est enfermé dans le crâne, et la moelle épinière protégée par la colonne vertébrale. Les deux sont protégés par le liquide cérébro-spinal, qui sert de tampon et limite les chocs traumatiques entre le cerveau et la boîte crânienne et entre la moelle épinière et les vertèbres. Le tout est protégé par trois couches de membranes connues comme les méninges. Le SNC peut être divisée de manière générale en deux tissus : la matière grise et la substance blanche. La matière grise est constituée de neurones avec leurs dendrites, de cellules gliales et de capillaires sanguins. La couleur de ce tissu est un peu rose due à l'abondance de ces capillaires sanguins. La substance blanche est constituée de la plupart des axones. Les axones sont recouverts de myéline, un recouvrement de membranes lipidiques qui protège les axones, aide les signaux nerveux à traverser de manière rapide les axones et donne à cette substance blanche sa couleur caractéristique. En règle générale, le cerveau se compose de la matière grise dans la zone corticale externe et de la substance blanche dans la zone médullaire interne, tandis que la moelle épinière est composée d'une organisation inversée.

3. Moelle épinière

La moelle épinière est la continuité de l'encéphale jusqu'à la région lombaire du bas du dos. Il parcourt toute la longueur du dos et se charge de véhiculer les informations entre le cerveau et le corps. De plus, la moelle épinière remplit d'autres fonctions comme les réflexes, au travers de circuits qui contrôlent les réponses involontaires. Ses circuits peuvent être également à la base de mouvements comme la marche. Son contrôle plus fin demandera l'intervention de certaines aires du cerveau.

La moelle épinière est connectée dans toute sa longueur aux nerfs du système nerveux périphérique depuis la peau, les muscles et les articulations. En fait, les ordres du cerveau parcourent la colonne vertébrale jusqu'aux muscles, ensuite en retour l'information sensorielle parcourt le tissu sensoriel à la moelle épinière jusqu'au cerveau. La moelle épinière est donc composée dans sa majorité des projections neuronales provenant du cerveau.

4. Le cerveau

Le cerveau ou encéphale permet de penser, percevoir, planifier et comprendre. Il est divisé en 4 lobes : temporal, occipital, pariétal et frontal. Il est constitué de trois parties :

- Le cerveau proprement dit qui est formé de deux hémisphères séparés par une scissure sagittale inter-hémisphérique.
- Le tronc cérébral qui est situé sous le cerveau, composé par la moelle allongée appelée le bulbe rachidien, le pont qui est la protubérance annulaire et le mésencéphale appelé pédoncule cérébral.
- Le cervelet est la partie de l'encéphale qui se situe en arrière du tronc cérébral et immédiatement sous le cerveau. Il sépare le cerveau des hémisphères cérébraux situés immédiatement au-dessus de lui.

Le SNC est un système essentiel pour l'Homme. Il est responsable de surveiller et coordonner le fonctionnement des organes internes et répond aux changements de l'environnement. Anatomiquement, le système nerveux central est protégé par le liquide céphalo-rachidien (LCR) et les méninges qui entourent le cerveau et la moelle

épinière. Il est protégé contre les agents exogènes et endogènes. Il est protégé contre la pénétration d'agents pathogènes, de cellules immunitaires circulantes et de facteurs sanguins par la barrière hémato-encéphalique maintenue conjointement par des jonctions serrées entre les cellules endothéliales cérébrales, la lame basale de ces cellules et les processus des extrémités des astrocytes (Louveau, Harris, & Kipnis, 2015).

B. Les cellules du système nerveux central :

Le SNC est composé des neurones et des cellules gliales. Les neurones reçoivent et envoient l'influx nerveux, et les cellules gliales protègent et soutiennent les neurones. Le dialogue entre tous les types cellulaires du système nerveux est important pour le bon fonctionnement du SNC. Il conditionne la réponse face au moindre changement de son microenvironnement. De plus, l'interrelation des neurones avec les capillaires sanguins est effectuée via les astrocytes et avec le support des cellules environnantes, incluant la microglie et les oligodendrocytes (Figure 1).

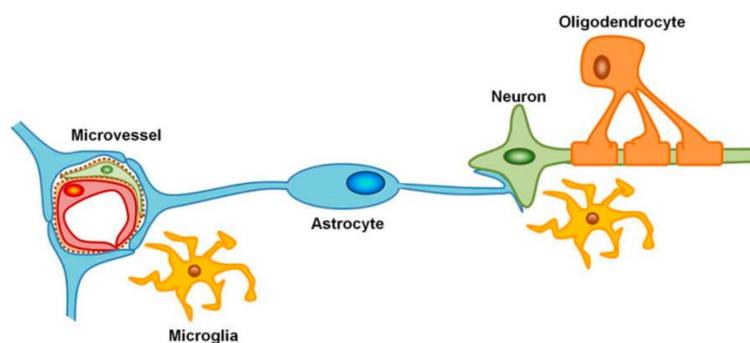


Figure 1: Les cellules du système nerveux central. Les neurones (vert) interagissent avec la neuro-glie : les oligodendrocytes (orange) et les astrocytes (bleu) mais aussi avec les cellules immunitaires résidentes du système nerveux, les cellules microgliales (jaune). L'interrelation entre vaisseaux sanguins et neurones dépend de la glie (Abeyasinghe et al., 2016).

1. Les neurones

Les neurones sont l'unité fondamentale du SNC, car ils sont responsables de l'émission et de la propagation d'informations nerveuses. Une preuve de la complexité du cerveau est le nombre de neurones. Il est composé de 100 milliards de neurones et d'encore davantage de cellules gliales. D'un point de vue morphologique, les neurones sont constitués d'un corps cellulaire, de dendrites renvoyant les informations externes

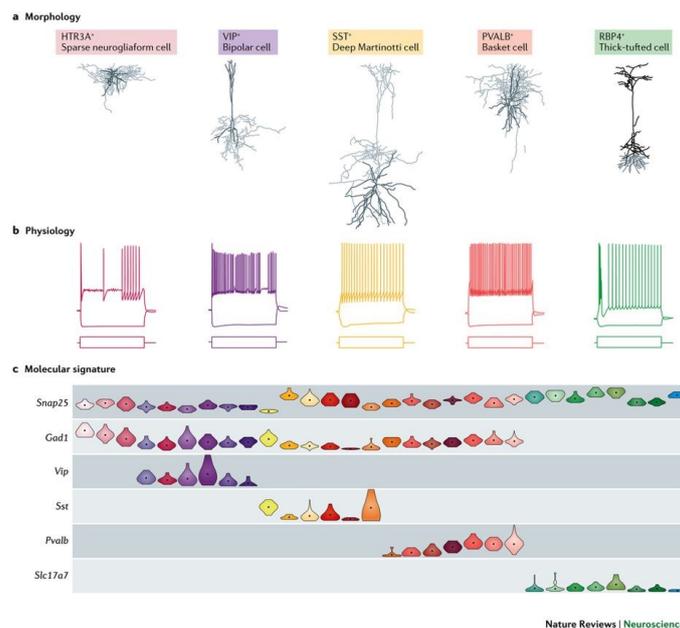
vers le corps cellulaire et d'un axone (un tiers des axones du SNC sont myélinisés) prolongeant les informations du corps cellulaire vers l'extérieur. La plupart des neurones ont plusieurs dendrites provenant de leurs corps cellulaires et un seul axone. Les dendrites ont comme fonction d'augmenter la surface disponible afin de recevoir les signaux (jusqu'à 400 000 dendrites maximum). L'axone est une structure tubulaire qui part du corps cellulaire et qui transmet les signaux électriques jusqu'à sa partie terminale où les neurotransmetteurs vont être libérés et où a lieu le contact synaptique avec un autre neurone. L'axone est parfois entouré de myéline qui isole les axones pour entre autre faciliter et accélérer la conductivité (saltatoire) du signal. De plus, il contient un grand nombre de neurofilaments et de microtubules, importants pour le maintien de l'intégrité cellulaire ainsi que pour le transport.

Les neurones sont des cellules excitables, qui communiquent entre elles par synapse, soit par une synapse électrique, soit par une synapse chimique. La synapse électrique a lieu après un rapprochement des neurones jusqu'à la création d'une jonction dans les canaux ioniques qui s'alignent alors parfaitement. Le contact est établi par la formation d'un pore au travers duquel les ions peuvent facilement diffuser du neurone présynaptique au neurone postsynaptique (Connors & Long, 2004). Dans le cas de synapses chimiques, il n'y a pas de jonction mais un petit espace entre deux neurones appelé fente synaptique, dans lequel le neurone présynaptique libère les neurotransmetteurs contenus à l'intérieur des vésicules synaptiques. Ensuite, grâce à des récepteurs du neurone postsynaptique, les canaux ioniques s'ouvrent ou se ferment ayant pour impact la possibilité de générer ou bloquer un potentiel d'action, en fonction respectivement du comportement excitateur ou inhibiteur du neurotransmetteur. Les synapses électriques sont considérées comme instantanées, tandis que les synapses chimiques sont un peu plus lentes et complexes.

Il existe un éventail de marqueurs immunohistochimiques pour les neurones. Les plus couramment utilisés sont : l'antigène nucléaire neuronal, ou Neuronal Nuclear Antigen (NeuN), la synaptophysine, le neurofilament, l'énolase spécifique des neurones (NSE) et les protéines associées aux microtubules 2 (MAP2).

1.1. Classification structurale des neurones

Les neurones ont été classés historiquement selon différents critères. D'un point de vue morphologique, ils peuvent être classés par rapport au nombre de dendrites. Ils se divisent en neurones multipolaires (plusieurs dendrites et un axone), bipolaires et unipolaires. En fonction des neurotransmetteurs qu'ils libèrent, ils peuvent être rangés en sous-groupes de neurones : cholinergiques, glutamatergiques et GABAergiques. La plupart utilisent la classification en rapport à la fonction, divisant ainsi les neurones en neurones sensoriels, moteur ou interneurones. La classification des neurones a toujours connu des limites, par le manque d'outils techniques d'abord et le niveau d'importance à accorder aux différents critères (morphologie et sécrétions) ensuite. Actuellement, il existe une nouvelle proposition de classification en trois catégories principales : morphologiques, physiologiques et moléculaires (Zeng & Sanes, 2017) (Figure 2).



Même en tenant compte de ces trois catégories, il subsiste une hétérogénéité au sein même de ces catégories. Les propriétés physiologique, morphologique et moléculaire peuvent en effet varier de façon très subtile. Bien qu'une correspondance aussi satisfaisante existe, ce n'est pas le cas pour tous les neurones (Zeng & Sanes, 2017). La classification neuronale reste donc un domaine d'étude très actif car si l'on distingue mieux les neurones, leur étude et leur compréhension n'en seront que plus aisées. Nous verrons plus tard que l'architecture du système nerveux chez la sangsue confère un plan d'organisation particulier pour les neurones et interneurones et permet ainsi d'appréhender plus facilement les relations avec la microglie.

2. Cellules gliales

Les neurones ne représentent qu'un faible pourcentage du nombre de cellules totales du système nerveux. En effet, ils sont en nombre inférieur par rapport aux cellules de soutiens, les « cellules gliales ». Ces dernières ont un rôle remarquable dans le maintien et le fonctionnement du SNC. Elles sont impliquées dans presque tous les aspects de l'activité neuronale et jouent un rôle essentiel dans le développement, les fonctions et les mécanismes neuropathologiques du SNC. Les cellules gliales comprennent les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales.

2.1. Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules neurogliales prédominantes du SNC. Ils ne sont retrouvés que dans le SNC et sont cinq fois plus nombreux que les neurones. Les astrocytes présentent une morphologie étoilée (d'où le préfixe astro = astre). Par le biais de leurs nombreuses ramifications, ils entrent en contact avec les vaisseaux sanguins cérébraux tels que les capillaires mais aussi avec les neurones, en restant très proche des synapses (Figure 3) (Demetrius, Magistretti, & Pellerin, 2014).

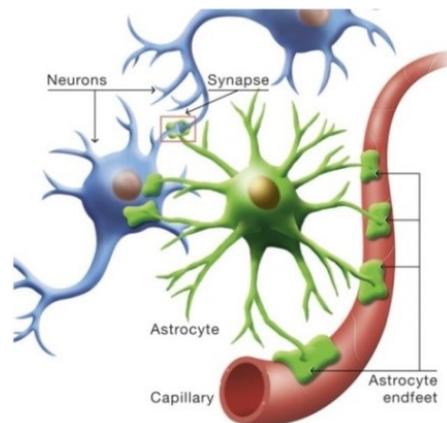


Figure 3: Relations cyto-architecturales des astrocytes. Les astrocytes (en vert) sont en contact avec les vaisseaux sanguins cérébraux tels que les capillaires (en rouge) par le biais de processus appelés pieds en extrémité. De plus, les astrocytes ont d'autres processus à proximité des neurones (en bleu) qui enserrant également les synapses (Demetrius et al., 2014).

Les astrocytes sont divisés en deux sous-types : les astrocytes stellaires fibrillaires et les astrocytes protoplasmiques. Les astrocytes stellaires fibrillaires sont retrouvés en majorité dans la substance blanche et présentent de longues ramifications (Bignami, Eng, Dahl, & Uyeda, 1972). Ce sous-type cellulaire entre en contact avec les nœuds de Ranvier, point où la gaine de myéline s'interrompt, laissant l'axone à nu. Les astrocytes protoplasmiques quant à eux se retrouvent dans la matière grise et présentent un nombre de ramifications plus important mais de taille plus courte. Ce sous-type cellulaire entre en contact et enveloppe les synapses. Différentes études neuroanatomiques indiquent également que les deux sous-types astrocytaires établissent des contacts étendus avec les vaisseaux sanguins mais aussi entre les ramifications des astrocytes voisins (Sofroniew & Vinters, 2010).

Le développement des astrocytes s'effectue après la production initiale des neurones dans de nombreuses régions du système nerveux central. Cependant, de manière intéressante pendant le développement du SNC, les signatures moléculaires produites par les astrocytes participent à l'orientation de la migration des axones en développement et à l'orientation de certains neuroblastes (Sofroniew & Vinters, 2010). En ce qui concerne le développement de la substance blanche, la perte ou le dysfonctionnement des connexines et des jonctions des astrocytes peut même conduire à une démyélinisation (Sofroniew & Vinters, 2010).

Une fois le cerveau formé, les astrocytes ont plusieurs rôles notamment dans le support physique pour les neurones, les méninges, mais aussi pour les vaisseaux sanguins voisins (Figure 3). De plus, Ils jouent aussi un rôle dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et du métabolisme du cerveau, en intervenant comme intermédiaires énergétiques et en limitant la diffusion excessive des neurotransmetteurs (Peterson & Fujinami, 2007).

Les questions posées sur les rôles des astrocytes dans la physiologie ainsi que la physiopathologie neurologique restent nombreuses. Dans des cas de lésion tissulaire, les astrocytes peuvent être activés par des stimuli inflammatoires afin de proliférer et migrer vers les sites de lésions. Les astrocytes peuvent alors former une cicatrice gliale afin d'isoler la zone lésée contre d'autres dommages. En revanche, Il est démontré que les astrocytes réactifs sont abondants dans diverses maladies neurodégénératives et plusieurs études suggèrent même que les astrocytes contribuent à la mort des neurones et des oligodendrocytes dans les troubles neurodégénératifs (Liddel et al., 2017). De plus, au cours des dernières années, il a été démontré dans plusieurs modèles que la composition moléculaire de la cicatrice gliale et la production des molécules inhibitrices par les astrocytes sont des facteurs contribuant à l'échec de la régénération des axones après une lésion du système nerveux central (Fitch & Silver, 2008). Cette inhibition de la régénération est concomitante à la production de cytokines pro-inflammatoires qui exacerbent la lésion. Bien que les astrocytes activés expriment des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II *in-vitro*, ils ne semblent pas capables de fonctionner comme des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) efficaces pour recruter des cellules pro-inflammatoires telles que les lymphocytes T CD4+ en raison de l'absence d'expression des molécules co-stimulatrices nécessaires (Aloisi et al., 2000). L'implication astrocytaire dans l'augmentation de l'état inflammatoire doit donc être relativisée par un contexte cellulaire bien plus complexe. En effet, des travaux utilisant une déplétion en astrocytes réactifs, ont démontré que ces derniers sont indispensables pour résister à une agression et qu'ils améliorent la récupération après un traumatisme du SNC. Les astrocytes peuvent avoir un effet bénéfique sur les lymphocytes T en induisant *in-vitro* un phénotype régulateur sur les lymphocytes T dans des rats atteints d'EAE

(Encéphalomyélite allergique expérimentale). Cette conversion en lymphocytes Treg entraîne une diminution significative de l'inflammation et conduit à un ralentissement de l'apparition de la maladie (Trajkovic et al., 2004).

Par conséquent, ces données démontrent que les astrocytes réactifs peuvent jouer des rôles à la fois bénéfiques et néfastes dans le SNC. Elles soulèvent la question de l'existence de différents sous-types astrocytaires réactifs. Les réponses astrocytaires à la lésion représentent un enchaînement complexe et dépendent, par l'ampleur du traumatisme, de l'implication et du dialogue avec les autres populations cellulaires (Sofroniew & Vinters, 2010). D'ailleurs, les interactions entre la microglie et les astrocytes représentent un champ d'investigation déterminant pour mieux comprendre le fonctionnement du cerveau et ses mécanismes de pathogénèse. Au cours du développement du cerveau sain par exemple, ces échanges sont essentiels pour le développement et l'élagage (pruning) des synapses (Bialas & Stevens, 2013; Hong et al., 2016; Stephan, Barres, & Stevens, 2012; Stevens et al., 2007). Les astrocytes libèrent des signaux induisant dans les neurones l'expression de gènes codant des molécules du complément (C1q et C3) et conduisant à leur exposition sur les synapses. Ces synapses sont ainsi taguées par les facteurs du complément afin de recruter des cellules microgliales qui les élimineront ensuite par phagocytose. Cette relation entre synapses et microglie repose donc sur un message astrocytaire et plus particulièrement sur une cascade moléculaire qui implique la signalisation TGF- β avec pour cible les éléments du complément (Bialas & Stevens, 2013). Nous aurons l'opportunité de revenir dans ce mémoire sur les similitudes moléculaires avec notre modèle sanguin.

2.2. Les oligodendrocytes

Les oligodendrocytes sont les cellules productrices de myéline du SNC. La myéline peut former une gaine présentant jusqu'à 300 couches de membranes autour de certains axones. Ils élaborent tous les jours environ trois fois leurs poids en membrane et peuvent supporter jusqu'à 100 fois le poids de leur corps cellulaire en membrane (Bradl & Lassmann, 2010). Le développement des oligodendrocytes est différent entre ceux présents dans la moelle épinière et ceux présents dans le cerveau. De plus, les

oligodendrocytes dans ces deux zones sont divisés en sous-classes différentes et ont une origine différente. Dans la moelle épinière, la grande majorité des oligodendrocytes dérivent d'un domaine précis de la zone ventriculaire ventrale, qui d'abord va donner naissance aux motoneurones et ensuite aux cellules précurseurs d'oligodendrocytes (CPOs). Ils vont migrer dans toute la moelle épinière et se différencier en oligodendrocytes pour finalement former la myéline (Lu et al., 2002; Sun, Pringle, Hardy, Richardson, & Smith, 1998). Trois vagues successives assurent la colonisation des différentes régions du cerveau en commençant par le télencéphale embryonnaire et finissant par le cortex postnatal (Kessaris et al., 2006). Il a d'ailleurs été démontré chez la souris que si une vague de colonisation est bloquée par des toxines, les CPOs des autres vagues viendront combler les territoires vacants et rétablir une distribution normale, sans conséquence sur le comportement, le développement ou la survie des animaux (Kessaris et al., 2006).

2.2.1. La Myélinisation

La myélinisation est un processus important qui sert à isoler et protéger les axones des neurones. Cette myéline permet aussi d'augmenter la vitesse de conduction de l'influx nerveux en isolant les axones électriquement et induisant une conduction saltatoire. La gaine de myéline aide aussi au regroupement des canaux sodiques le long de l'axone, ce qui améliore le transport axonal, et apporte un soutien trophique aux neurones par la libération de facteurs neurotrophiques tels que le facteur neurotrophique dérivé de la glie (GDNF), le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et le facteur de croissance de l'insuline (IGF-1) (Bradl & Lassmann, 2010).

Le début de la myélinisation est déterminé par un signal essentiel qui semble être fourni par l'activité électrique des neurones. L'activité électrique neuronale déclenche la libération d'ATP qui sert de médiateur dans la communication entre les neurones et les cellules gliales. Cette libération inhibe la prolifération des CPOs et stimule leur différenciation pour la formation de myéline (Stevens, Porta, Haak, Gallo, & Fields, 2002). De façon intéressante, l'ATP libéré par les axones agirait par l'intermédiaire des astrocytes qui produisent le facteur LIF pour favoriser la myélinisation par les oligodendrocytes matures (Ishibashi et al., 2006). Une fois de plus, ce mécanisme

démontre que le dialogue établi entre toutes les populations cellulaires est indispensable au bon fonctionnement du cerveau.

2.3. La microglie

Le système nerveux central est un organe immunocompétent dont le statut immunitaire est loin d'être absolu et peut grandement varier selon l'âge et la région cérébrale (Galea, Bechmann, & Perry, 2007). Les réponses immunitaires sont d'abord exercées par les cellules immunitaires résidentes du SNC, à savoir les cellules microgliales et les autres cellules myéloïdes, les macrophages méningés et ceux des plexus choroïdes (Louveau et al., 2015). Ce statut de cellules protectrices leur confère d'importantes capacités de communication avec les neurones.

2.3.1. Caractéristiques

Les cellules microgliales, ou microglie, ont été décrites pour la première fois par Pío del Río-Hortega à partir des années 1920 (Rio-Hortega, 1920, 1939). Ce sont des cellules de petite taille en forme d'étoiles qui représentent entre 5 à 20 % de la population gliale totale et entre 5 et 10 % des cellules totales du cerveau. Les cellules microgliales sont les macrophages résidents du parenchyme cérébral dans le système nerveux central (SNC) et sont considérées comme les principales cellules orchestrant la réponse immunitaire dans le SNC. De nombreux travaux se sont focalisés sur les cellules microgliales et leurs effets sur les neurones (Herz, Filiano, Smith, Yogev, & Kipnis, 2017).

La microglie est située dans le parenchyme et occupe toutes les régions du système nerveux central (SNC) des mammifères. Elle est associée par ses activités à plusieurs maladies neurodégénératives et aux états neuro-inflammatoires anormalement élevés (Ginhoux et al., 2010). Ces cellules peuvent être à la fois une cause et une conséquence de la dérégulation des événements inflammatoires associés aux maladies neurodégénératives (Sankowski et al., 2015). Bien que le rôle de la microglie dans les états pathologiques du SNC ait été largement étudié, leur contribution à la physiologie normale du SNC reste difficile à étudier. Malgré leurs similitudes avec divers autres

macrophages résidant dans les tissus périphériques, elles possèdent deux propriétés uniques : leur origine uniquement prénatale et leur longévité (Prinz et al., 2017).

L'implication de la microglie est essentielle au maintien du SNC que ce soit dans une condition saine mais aussi pathologique (Prinz & Priller, 2014). La microglie est cruciale pour l'homéostasie cérébrale grâce au contrôle exercé sur la prolifération et la différenciation des neurones, ainsi que sur la formation des connexions synaptiques (Ginhoux & Prinz, 2015). Elle contribue à la modification et à l'élimination des structures synaptiques aberrantes dans le cerveau en développement mais aussi dans le cerveau adulte en bonne santé (Bialas & Stevens, 2013; Tremblay, Lowery, & Majewska, 2010). Ainsi, les cellules microgliales occupent une position centrale dans la défense et le maintien du système nerveux central et constituent par conséquent une cible clé pour le contrôle neuro-inflammatoire dans le traitement des troubles neurologiques et psychiatriques (Ginhoux & Prinz, 2015).

Une notion très importante est que les cellules microgliales sont des sentinelles capables de réagir aux changements locaux et très fins de leur microenvironnement (Lavin et al., 2014). Plusieurs études récentes montrent que la microglie répond à son environnement en tenant compte de critères jusqu'ici ignorés : le sexe, l'âge et même le microbiome de l'individu (Rahimian et al., 2018; Thion et al., 2018). C'est pourquoi, actuellement, de nombreuses études essaient d'intégrer ces critères pour développer de nouvelles cibles pharmacologiques (Rahimian et al., 2018). Par conséquent, malgré des décennies de recherche dans le domaine des cellules microgliales, il reste encore beaucoup à découvrir sur ces cellules afin de mieux comprendre leurs fonctionnements tant en conditions saine que pathologique.

2.3.2. Origine

Depuis la découverte des cellules microgliales par del Rio-Hortega il y a bientôt 100 ans, plusieurs théories ont été discutées sur leur origine. C'est n'est que récemment qu'il a été démontré que les cellules microgliales proviennent de précurseurs embryonnaires du sac vitellin et non du foie fœtal (Ginhoux et al., 2010). Ces études ont montré que les cellules microgliales colonisent le cerveau au début du développement embryonnaire chez la souris (9^{ième} jour embryonnaire), et que les

progéniteurs hématopoïétiques postnataux ne contribuent pas de manière significative à l'homéostasie de la microglie dans le cerveau adulte. Ainsi, ces résultats identifient la microglie comme une population ontogénétiquement distincte des monocytes/macrophages sanguins (Ginhoux et al., 2010). Ensuite il a été démontré que les cellules progénitrices de la microglie dérivent des précurseurs érythromyéloïdes (PEMs) présents dans le sac vitellin (Kierdorf et al., 2013). Deux facteurs de transcription ont été révélés comme essentiels pour leur développement, les facteurs PU.1 (PU-box binding transcription factor 1) et IRF8 (interferon regulatory factor 8) (Goldmann et al., 2016). Ces cellules progénitrices donnent naissance aux cellules macrophagiques immatures du sac vitellin qui coloniseront le cerveau embryonnaire (Gomez Perdiguero et al., 2015; Kierdorf et al., 2013). Des résultats suggèrent que ces cellules progénitrices sont positives pour RUNX1⁺ lorsqu'elles migrent du sac vitellin vers le cerveau par les vaisseaux sanguins entre les stades embryonnaires E8.5 et E9.5 (Figure 4) (Ginhoux et al., 2010).

La nature et l'heure précise où les PEMs apparaissent est encore en discussion (Ginhoux & Williams, 2016). Il est encore très compliqué de comprendre la séquence exacte chez les modèles rongeurs par le fait que les vagues d'hématopoïèse se chevauchent dans le temps. Concernant l'origine des PEMs, deux théories existent (Li & Barres, 2017).

La première théorie stipule qu'il existe deux types de précurseurs érythromyéloïdes, primaires et secondaires, dans le sac vitellin. Ces deux types cellulaires vont arriver au cours de deux vagues d'hématopoïèse. Les PEMs primaires donneront lieu aux microglies présentes dans le cerveau alors que les PEMs secondaires donneront lieu aux macrophages tissulaires (Hoeffel et al., 2015). Les PEMs primaires seraient dépendants du récepteur CSF1R (Colony stimulating factor 1 receptor) et indépendants du facteur de transcription MYB (c-myb) (Ginhoux et al., 2010; Hoeffel et al., 2015). Les PEMs secondaires n'expriment pas le récepteur CSF1R et sont dépendants du facteur de transcription MYB (Ginhoux & Williams, 2016; Hoeffel et al., 2015). Il est donc démontré que la signalisation CSF1R est essentielle au cours de l'embryogenèse et que les PEMs primaires dépendent de cette signalisation pour leur prolifération, leur différenciation et leur survie (Ginhoux et al., 2010). Le blocage de ce récepteur élimine

efficacement les macrophages primitifs embryonnaires (Hoeffel et al., 2015). De manière cohérente, les souris dépourvues de CSF1 ou d'IL-34, deux ligands partiellement redondants pour CSF1R, présentent une diminution du nombre de microglies adultes (Ginhoux et al., 2010). Il convient de noter que le CSF1 est largement exprimé par les différents types de cellules neurales, alors que l'IL-34 est spécifiquement produite par les neurones (Figure 4).

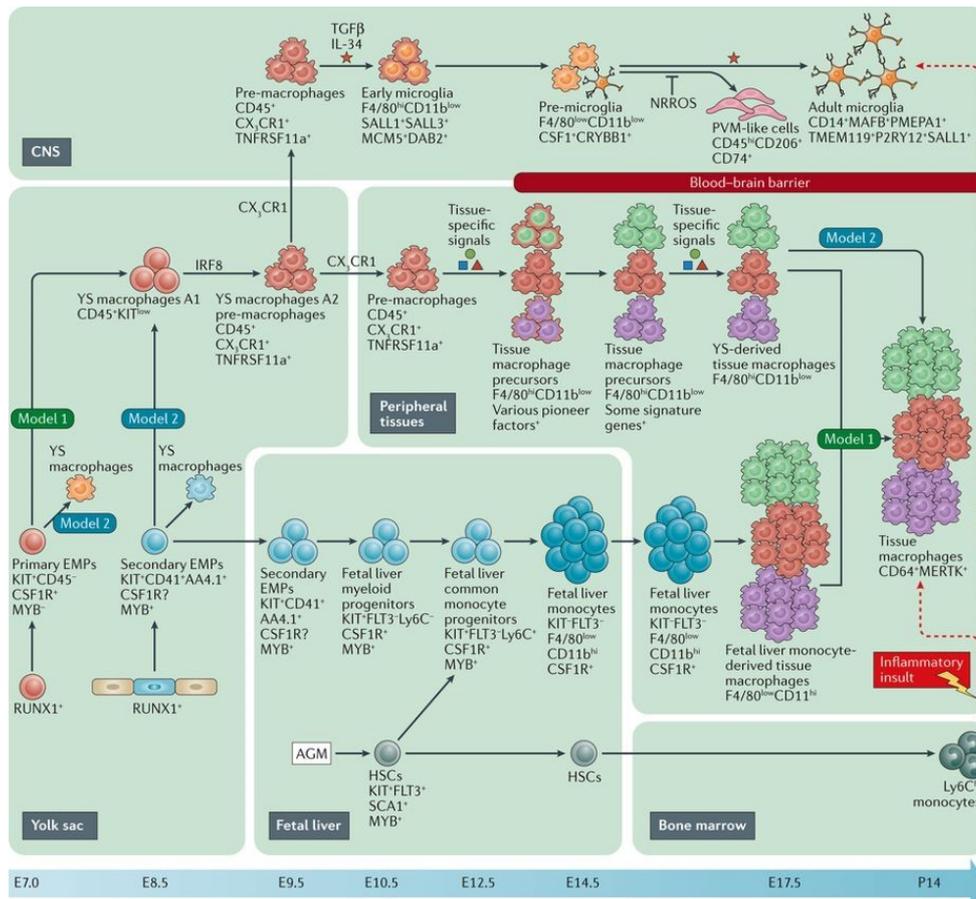


Figure 4 : Origine des cellules microgliales. Deux modèles différents en ce qui concerne les origines précises de la microglie et d'autres macrophages tissulaires, ainsi que les contributions relatives des macrophages du sac vitellin (Yolk sac) et des monocytes du foie fœtal (Fetal liver) aux macrophages résidents du tissu périphérique (Peripheral tissues). Les marqueurs de surface et la signature des cellules à chaque étape intermédiaire sont indiqués. De la même façon, certaines protéines clés sont au-dessus des flèches. Les symboles colorés sur certaines flèches font référence à des signaux importants spécifiques aux tissus pour la différenciation et la maturation d'une population de macrophages donnée. Les signaux d'origine cérébrale pour le développement microglial sont inconnus (étoile rouge) (Li & Barres, 2017).

La seconde théorie stipule qu'il n'existe qu'un seul type de PEMs, qui correspondrait aux PEMs secondaires de la première théorie. Ces cellules vont générer les macrophages immatures (Cellules A1) qui donneront lieu à la fois à la microglie, et aux

cellules progénitrices myéloïdes qui donneront les macrophages tissulaires (Ginhoux & Williams, 2016). Même si l'origine des PEMs n'est pas encore complètement clarifiée, ces différentes études montrent que ce sont les PEMs provenant du sac vitellin qui sont à l'origine des cellules microgliales (Li & Barres, 2017). La maturation des cellules microgliales se déroule en deux temps. Tout d'abord elles vont devenir des macrophages immatures (Cellules A1) $CD45^+$ et $c-kit^{low}$ et ensuite des macrophages immatures (Cellules A2) qui présentent la signature $c-kit$. Elles conservent la signature $CD45^+$ et acquièrent la signature CX_3CR1^+ (Récepteur de la fractalkine ou CX_3CL1). Ces cellules de type A2 ou « macrophage migratoire » ont besoin du facteur IRF8 (interferon regulatory factor 8) (Kierdorf et al., 2013), pour pouvoir proliférer et se différencier en précurseurs macrophagiques, envahissant enfin le SNC embryonnaire (Figure 4) (Li & Barres, 2017).

En ce qui concerne l'infiltration dans le cerveau, des études suggèrent que les cellules arrivent par la circulation sanguine, même s'il n'y a pas encore de démonstrations directes. Les études ont montré que l'apparition de la vascularisation a lieu en même temps que l'arrivée des cellules progénitrices macrophagiques dans l'embryon. De plus, chez des souris présentant un battement cardiaque anormalement bas, la vitesse d'infiltration microgliale est diminuée dans le cerveau (Ginhoux et al., 2010).

Il est intéressant de noter que le récepteur de la fractalkine ($CX3CR1$) est nécessaire à la bonne dispersion des précurseurs macrophagiques dans les embryons de souris. Chez les souris dépourvues d'expression de $CX3CR1$, davantage de précurseurs sont bloquées dans le sac vitellin. Par contre, ce défaut n'est que temporaire ce qui indique qu'il doit y avoir d'autres signaux encore non identifiés qui attirent l'infiltration des précurseurs macrophagiques dans le SNC (Li & Barres, 2017). Des études réalisées chez le poisson zèbre suggèrent que la libération de lysophosphatidylcholine ou de nucléotides libérés par les neurones apoptotiques pourraient fonctionner comme des signaux chimiotactiques pour attirer les précurseurs microgliaux dans le cerveau (Casano, Albert, & Peri, 2016; J. Xu, Wang, Wu, Jin, & Wen, 2016).

En condition physiologique normale, les PEMs sont l'unique source des cellules microgliales, dû à la fermeture de la barrière hématoencéphalique qui a lieu en même temps que l'infiltration des monocytes du foie embryonnaire dans les tissus

périphériques. De ce fait, l'entrée des monocytes dans le cerveau est bloquée (Daneman, Zhou, Kebede, & Barres, 2010). Cependant, dans certaines conditions, d'autres cellules peuvent infiltrer le cerveau et devenir des cellules apparentées à la microglie. Quand les macrophages du sac vitellin sont éliminés, une nouvelle population microglie F4/80^{low}CD11b^{hi} apparaît plus tard dans le cerveau fœtal, ce qui suggère que d'autres cellules peuvent devenir progénitrices des futures cellules microgliales, même si l'on ne peut pas à ce stade confirmer qu'elles portent exactement les mêmes fonctions qu'une microglie dite normale (Hoeffel et al., 2015).

2.3.3. Maturation des cellules microgliales

Des facteurs de transcriptions tels que RUNX1 et IRF8 sont des régulateurs indispensables de la différenciation de la microglie au cours du développement embryonnaire chez la souris (Ginhoux et al., 2010). Il est établi que RUNX1 aurait aussi une fonction durable dans la prolifération et l'homéostasie de la microglie postnatale (Prinz & Priller, 2014). Une fois les précurseurs macrophagiques infiltrés dans le SNC, ils vont recevoir des signaux issus du microenvironnement pour activer leur maturation, qui sera complète au 14^{ième} jour postnatal (Li & Barres, 2017). Certains facteurs de transcription ou certaines signalisations ont été décrits comme essentiels pour la maturation des cellules microgliales.

Tout d'abord, la signalisation TGF- β a été montrée dans la spécialisation microgliale (Butovsky et al., 2014; Gosselin et al., 2014). Elle semble être essentielle pour la maturation des précurseurs macrophagiques. Quand les cellules microgliales primaires sont cultivées avec le CSF1 et le TGF- β , il y a une augmentation modérée mais significative de l'expression des gènes de la signature microgliale (Butovsky et al., 2014). De plus, la culture des macrophages péritonéaux avec du TGF- β induit la transcription de certains gènes spécifiques de la microglie (Gosselin et al., 2014). Une étude récente a montré que le TGF- β , le cholestérol et le CSF1 sont sécrétés par les astrocytes et que ces dernières vont soutenir fortement la survie microgliale *in-vitro* (Bohlen et al., 2017). Même si le TGF- β est insuffisant pour induire une différenciation microgliale complète (Bohlen et al., 2017; Gosselin et al., 2017), il a été démontré que l'exposition chronique des cellules microgliales au TGF- β les rend moins susceptibles

de subir une conversion d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire sous le contrôle d'IRF7 en cas de lésion (Cohen et al., 2014). Ces données démontrent non seulement qu'il y a un rôle clé des facteurs environnementaux spécifiques des tissus dans la détermination du devenir des cellules myéloïdes, mais aussi que la signalisation médiée par TGF- β est très importante car elle peut moduler de manière complexe l'activation des cellules microgliales dans des conditions pathologiques. Nous reviendrons sur cette signalisation au cours de ce travail.

Un autre facteur de transcription important, SALL1, est considéré comme un marqueur spécifique de la microglie. Des études démontrent que cette protéine promeut des identités microgliales quiescentes dans l'environnement du système nerveux central et que sa désactivation peut entraîner une perte d'expression des gènes codant pour les signatures microgliales (Buttgereit et al., 2016) De la même façon, une invalidation de NRROS entraîne une perte de ces signatures microgliales (Tmem119, P2ry12 et Sall1 par exemple) et une augmentation de l'expression des gènes codant des marqueurs de macrophages périvasculaires (Wong et al., 2017). De ce fait, NRROS et SALL1 sont très importants pour la maturation des cellules microgliales. En revanche, NRROS n'est pas nécessaire chez l'adulte, alors que le facteur de transcription SALL1 est requis pour maintenir l'identité microgliale (Li & Barres, 2017).

2.3.4. Renouvellement

Contrairement à d'autres macrophages résidant dans les tissus, la microglie et les macrophages du SNC (à l'exception des macrophages du plexus choroïde) ne sont pas remplacés par des macrophages dérivés des progéniteurs du foie fœtal ou de la moelle osseuse (Ginhoux & Guilliams, 2016; Goldmann et al., 2016). Au stade embryonnaire, les cellules microgliales subissent un auto-renouvellement local, ce qui permet leur expansion au cours du développement, conjointement avec l'expansion du SNC, et permet leur maintien à l'âge adulte (Silvin & Ginhoux, 2018).

En condition physiologique, il a été montré chez l'adulte que les cellules microgliales CX3CR1⁺ possèdent une plasticité et un potentiel de réplication nécessaire à la formation de clones (Tay et al., 2017). Le renouvellement n'est pas exponentiel sauf

dans des cas pathologiques. Ce phénomène répond au besoin de rétablir l'homéostasie tissulaire. Cependant, les signaux déclencheurs qui autorisent la microglie à se diviser restent inconnus. De plus, on ignore si la maintenance microgliale est assumée par un petit groupe de progéniteurs hétérogènes ou si elle est répartie dans la population microgliale à l'âge adulte (Silvin & Ginhoux, 2018). C'est pourquoi, le réel potentiel de la microglie endogène dérivée du sac vitellin à restaurer sa population après une déplétion ainsi que le fait de savoir si ces cellules peuvent être remplacées par des cellules dérivées de la moelle osseuse ou par des monocytes en circulation restent en débat (Larochelle, Bellavance, Michaud, & Rivest, 2016). Cependant, deux études indépendantes ont signalé l'existence d'un progéniteur microglial potentiel. Il a été démontré qu'après déplétion des cellules microgliales, le tissu nerveux retrouve une densité normale de cellules microgliales après seulement 14 jours. De plus, elles seraient renouvelées exclusivement à partir d'un pool interne de cellules résidentes exprimant le récepteur à l'IL-1, et de façon transitoire la Nestine, et indépendamment des cellules issues de la moelle osseuse (Bruttger et al., 2015; Elmore et al., 2014). Ces découvertes soulèvent la possibilité que des progéniteurs hématopoïétiques soient présents dans le SNC et aient la capacité de se différencier en cellules microgliales (Larochelle et al., 2016).

2.3.5. Marqueurs microgliaux

L'intérêt principal des chercheurs est d'abord de pouvoir trouver des marqueurs qui aident à la différenciation entre les cellules microgliales et les autres cellules macrophagiques. Cela permettrait d'étudier et de manipuler uniquement les cellules microgliales afin de comprendre mieux leurs fonctions, sans interférer avec les autres cellules macrophagiques. De plus, les marqueurs spécifiques pourront être corrélés à un état particulier : état normal, différentes conditions pathologiques ou état de vieillissement (Sousa, Biber, & Michelucci, 2017). Néanmoins, ces études sont très compliquées car les cellules microgliales perdent rapidement leurs signatures spécifiques une fois collectées et placées hors du cerveau, même dans des milieux de culture complétés par des facteurs endogènes (Bohlen et al., 2017; Gosselin et al., 2017). Ce niveau de complexité augmente encore par le fait qu'il existe une

hétérogénéité microgliale dépendante de la région d'origine dans le cerveau (Grabert et al., 2016; Silvin & Ginhoux, 2018). Certains marqueurs des cellules microgliales ou des expressions géniques caractéristiques, peuvent cependant aider à les différencier des autres cellules myéloïdes du SNC.

La microglie exprime à des niveaux très élevés plusieurs marqueurs classiques de macrophages, tels que CD11b, CSF-1R, F4/80, CD200R et CD172 α . À l'inverse, elle exprime à un niveau intermédiaire le marqueur CD45, par opposition aux autres populations de macrophages (Low, 2018). D'autres études ont identifié des signatures génétiques (*Olfml3*, *Tmem119* et *Siglec-H*) exprimées à des niveaux très élevés dans la microglie et presque absentes dans les macrophages et les monocytes (Chiu et al., 2013). Notons que le récepteur CX3CR1, largement utilisé pour caractériser la dynamique de la microglie *in vivo* (Nimmerjahn, Kirchhoff, & Helmchen, 2005; Schafer et al., 2012), n'est pas présent dans les gènes exprimés à des niveaux très élevés. Cependant, il reste un bon marqueur de la microglie car il n'est pas présent dans les cellules myéloïdes mononuclées infiltrant le SNC (Chiu et al., 2013). Ces signatures ne sont pas exclusivement restreintes à la microglie. Des signatures génétiques exclusives de la microglie ont été rapportées et comprennent les gènes codant P2ry12, Fcrls, Hexb, Tmem119, Tgfbr1 et Sall1 (Butovsky et al., 2014; Chiu et al., 2013; Lavin et al., 2014). Certains d'entre eux ont été validés a posteriori. Tmem119 a été validé comme marqueur spécifique de la microglie chez la souris et l'Homme même s'il pourrait ne pas être exprimé par toutes les microglies issues des différentes régions du cerveau et pendant le développement (Bennett et al., 2016; Satoh et al., 2016). Son expression dans les autres macrophages résidant dans le SNC reste toutefois à définir (Bennett et al., 2016). Le récepteur purinergique P2ry12 est, quant à lui, exprimé seulement par les cellules microgliales y compris chez l'Homme (Goldmann et al., 2016; Mildner, Huang, Radke, Stenzel, & Priller, 2017). Le facteur de transcription Sall1 a, lui aussi, été retrouvé comme marqueur spécifique des cellules microgliales (Buttgereit et al., 2016; Lavin et al., 2014). Il est décrit comme un facteur de transcription essentiel pour le maintien de l'identité et des fonctions microgliales (Buttgereit et al., 2016). Par conséquent, de plus en plus de données moléculaires proposent des outils capables d'identifier avec plus ou moins d'ambiguïté chaque population macrophagique du SNC.

Ces outils seront déterminants dans des conditions pathologiques afin de pouvoir différencier la microglie des autres cellules macrophagiques du SNC et des macrophages infiltrants.

2.3.6. Les différents états de la microglie

Dans des situations physiologiques, les cellules microgliales présentent une morphologie en étoile apparentée à un état d'immunosurveillance (Kettenmann et al., 2011). Grâce aux outils d'imagerie en temps-réel, des études ont démontré que les cellules microgliales statiques sont en réalité très dynamiques (Nimmerjahn et al., 2005). Même si leur corps est immobile, leurs prolongements sont régulièrement en mouvement afin de surveiller l'activité du cerveau (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Elles sont alors capables d'évaluer complètement le parenchyme cérébral en quelques heures et ne sont jamais quiescentes (Tremblay, Lecours, Samson, Sánchez-Zafra, & Sierra, 2015). En outre, des signaux de danger peuvent activer les cellules microgliales. Dans des conditions homéostatiques, les microglies sont maintenues dans leur état de repos par des signaux environnementaux « off ». Ces signaux, incluant des ligands de récepteurs microgliaux tels que TGF- β , CD200, CX3CL1 ou encore SIRP α , maintiendraient la microglie dans un état physiologique d'immunosurveillance (Abutbul et al., 2012; Hanisch & Kettenmann, 2007). A l'inverse, des signaux environnementaux « on » déclenchent leur activation et peuvent correspondre à des signaux exogènes (composants bactériens, viraux etc.) reconnus par des récepteurs de la famille TLR entre autre, et à des signaux endogènes tels que des neurotransmetteurs ou des médiateurs tels que l'ATP (Davalos et al., 2005; Eggen, Raj, Hanisch, & Boddeke, 2013; Kettenmann et al., 2011).

Cette activation s'accompagne d'un changement de morphologie, vers une forme amiboïde pour entrer en mouvement, et d'une production de facteurs inflammatoires (Kettenmann et al., 2011). La microglie activée possède un phénotype analogue à celle des macrophages activés, d'où la difficulté de leur discrimination en cas de rupture de la barrière hématoencéphalique (Kettenmann et al., 2011). Le nombre de cellules microgliales impliquées dans la réponse dépendra de l'intensité du signal même si les cellules à proximité immédiate sont avant tout activées.

Des états intermédiaires d'activation beaucoup plus diversifiés et dynamiques qu'on ne le croyait auparavant sont mis en jeu, ce qui peut expliquer la possibilité de phénotypes plus neuroprotecteurs ou plus neurotoxiques (Hanisch & Kettenmann, 2007). L'activation des cellules microgliales n'est donc plus considérée comme le passage d'un état quiescent à un état d'alerte. Il s'agit en réalité d'un processus très divers et dépendant des signaux d'activation nécessitant des phénotypes et des réponses adaptées. Dans un premier cas (phénotype 1), les cellules microgliales peuvent développer des fonctions bénéfiques lors d'épisodes d'activation transitoire, pouvant répondre au stimulus et agir sans se transformer complètement en un état activé (Hanisch & Kettenmann, 2007). Dans les deux autres cas (phénotypes 2 et 3), elles deviennent amiboïdes et mobiles. La réponse microgliale peut alors entraîner une libération des facteurs pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires et peut ou non, être accompagnée de phagocytose (Hanisch & Kettenmann, 2007; Raivich et al., 1999). À ce stade, l'activation dépend de la gravité de la lésion et notamment de la présence ou de l'absence de mort cellulaire (Raivich et al., 1999). En effet, lors d'une activation excessive ou chronique, les cellules microgliales adoptent un modèle d'activation aberrant pouvant induire des dommages collatéraux causés par une production prolongée de cytokines pro-inflammatoires, de dérivés oxygénés et d'autres molécules cytotoxiques (Larochelle et al., 2016). L'activité phagocytaire est déclenchée par la présence de motifs pathogènes étrangers accompagnée dans ce cas d'une libération de facteurs inflammatoires. Elle peut aussi être déclenchée pour éliminer des cellules endogènes en apoptose ou des débris de myéline par exemple, avec le plus souvent dans ce cas la libération de facteurs anti-inflammatoires (Hanisch & Kettenmann, 2007).

Parmi les cellules activées, une partie pourrait revenir à un état quiescent (Raivich et al., 1999) ou même rester avec un phénotype «post-activées» (Hanisch & Kettenmann, 2007). Les cellules gardant un phénotype « post-activée » garderaient une certaine mémoire pour réagir plus rapidement à des signaux de danger identiques (Hanisch & Kettenmann, 2007). Des outils de détection de la microglie activée reposent sur l'augmentation de certains marqueurs tels que CD11b, CD45, F4/80 et Iba1.

Les multiples phénotypes microgliaux

Les cellules microgliales peuvent répondre aux lésions en devenant activées et en développant des phénotypes classiques de type M1 (proinflammatoires) ou alternatifs de type M2 (anti-inflammatoires), la microglie en immunosurveillance étant assimilée à un phénotype M0 (Lan et al., 2017; Prinz & Priller, 2014). La polarisation M1 est associée à des effets cytotoxiques sur les neurones et les oligodendrocytes *in vitro*, alors que la polarisation M2 présente une capacité phagocytaire et favorise la survie neuronale (Prinz & Priller, 2014). Il a été démontré que les cellules microgliales peuvent changer de phénotype dans différentes conditions. Par exemple, dans des modèles animaux induisant des accidents vasculaires cérébraux, des lésions cérébrales traumatiques ou des lésions de la moelle épinière, les cellules microgliales passent d'un phénotype M2 transitoire à un phénotype M1 (Prinz & Priller, 2014). De manière intéressante, dans les maladies inflammatoires et neurodégénératives humaines, il est encore difficile de trouver des preuves de polarisation phénotypique car des marqueurs M1 et M2 sont co-exprimés (Prinz & Priller, 2014). Si des stratégies visant à inhiber la microglie de phénotype M1 ou à stimuler la microglie M2 peut être une voie intéressante dans certaines conditions pathologiques, les deux réponses jouent en réalité un rôle essentiel à différents stades dans la réparation des tissus (Lan et al., 2017).

Ce concept de polarisation M1/M2 a d'ailleurs été remis en question et très critiqué ces dernières années (Ransohoff, 2016). Cette séparation est désormais reconnue comme une simplification excessive des réponses microgliales, souvent observée dans des situations d'activation *in vitro* mais ne correspondant pas à des situations *in vivo* (Lan et al., 2017). Une nouvelle classification se fonde maintenant sur une immunosurveillance M0 et des états d'activation soit d'un seul type M1, soit de trois sous-types M2 : M2a, M2b et M2c. Les marqueurs typiquement considérés pour le phénotype pro-inflammatoire M1 sont les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6, TNF, les récepteurs de surface CD86, CMH-II, et des enzymes métaboliques comme iNOS (Lan et al., 2017). Concernant le phénotype M2, M2a contribue principalement à la régénération cellulaire et se caractérise par la production de cytokines (IL-4 et TGF- β) et du récepteur au mannose CD206. Les sous classes M2b/M2c portent des caractéristiques communes telles que les cytokines IL-10 et G-CSF, l'enzyme cytosolique arginase 1 (Arg1) et le récepteur CD163 et participent à la phagocytose et à l'élimination des débris tissulaires (Lan et al., 2017).

2.3.7. Les fonctions microgliales

En tant que cellules effectrices immunitaires du SNC, la microglie joue un rôle central dans son homéostasie par des mécanismes de neuroprotection et de réparation nerveuse (Sousa et al., 2017). Les cellules microgliales ont des fonctions immunitaires diverses telles que la surveillance de leur environnement, la phagocytose des débris et des cellules mortes et le cas échéant, la régulation de la réponse inflammatoire (Silvin & Ginhoux, 2018). Des études récentes ont montré que les cellules microgliales fœtale et adulte contribuent à divers processus liés au développement du cerveau.

2.3.7.1. Le rôle central de la microglie en tant que phagocytes

Issue de la lignée myéloïde comme les macrophages, la microglie exerce des fonctions de phagocytose (Gomez-Nicola & Perry, 2015). La phagocytose contribue à éliminer les bactéries, les cellules en apoptose ainsi que les débris cellulaires (Sierra, Abiega, Shahraz, & Neumann, 2013). Ce nettoyage est primordial pour l'intégrité du tissu nerveux et intervient également dans les différentes situations pathologiques, pour l'élimination des débris axonaux ou de myéline dans les lésions de la moelle épinière ou la sclérose en plaque, ou encore l'élimination des dépôts de peptides amyloïde- β dans la maladie d'Alzheimer (Sierra et al., 2013). La phagocytose se décompose en trois étapes, les mêmes que celles utilisées par les macrophages et les cellules dendritiques. Ces trois étapes sont définies comme suit : « trouve-moi, mange-moi et digère-moi » ou « find-me, eat-me, and digest-me » (Figure 5) (Sierra et al., 2013).

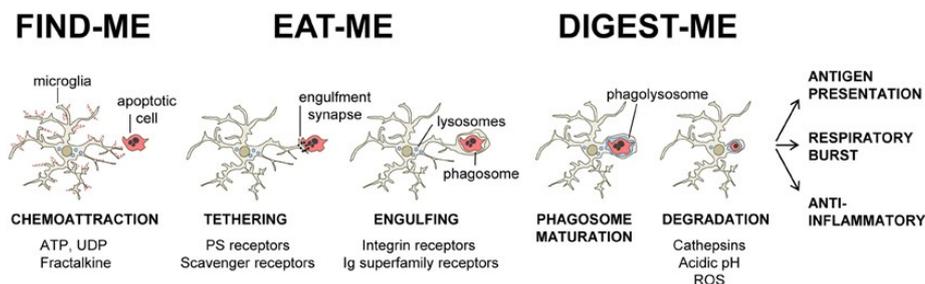


Figure 5 : Les trois étapes successives de la phagocytose dans les cellules microgliales. Dans des conditions physiologiques, les processus microgliaux sont très mobiles et répondent aux molécules chemoattractantes libérées par les cellules endommagées ou apoptotiques (signaux «find-me») telles que les fractalkines et les nucléotides extracellulaires (ATP, UDP). Ensuite, une synapse d'absorption est formée entre une série de récepteurs microgliaux et leurs ligands dans la membrane de la cellule apoptotique (signaux "eat-me"), conduisant à l'attache et à l'engloutissement de la cellule apoptotique dans un phagosome. Le phagosome devient mature en fusionnant avec des lysosomes et d'autres organites, et la cellule apoptotique est complètement dégradée dans le phagolysosome en moins de 2 heures (Sierra et al., 2013).

La phagocytose exercée par les cellules microgliales permet en effet de capturer des antigènes pour ensuite les exposer via son CMH de classe II, et ainsi déclencher une réponse immunitaire dépendante de lymphocytes T CD4+ en cas d'infiltration lymphocytaire. Ainsi, la microglie peut fonctionner comme une cellule présentatrice d'antigène (CPA), de la même façon que les macrophages dans les méninges, les plexus choroïdes et les espaces périvasculaires et se faire le relai d'une réponse immunitaire plus large (Colonna & Butovsky, 2017).

Dans des conditions d'ischémie ou de neuroinflammation, les cellules microgliales peuvent phagocyter des neurones encore en vie, contribuant ainsi à la gravité pathologique ou à la neuro-inflammation (Neher et al., 2013). Toutefois, dans son ensemble, la phagocytose représente un phénomène bénéfique (Sierra et al., 2010). Les cellules microgliales permettent un équilibre en contrôlant la mort cellulaire et en évitant la sécrétion délétère de cytokines pro-inflammatoires (Gomez-Nicola & Perry, 2015). Les cellules microgliales phagocytaires sont parfois capables de réaliser cette tâche sans changer leur état d'activation, en tant que microglie non-modifiée. Cela a été démontré au niveau de niches de neurogenèse au sein de l'hippocampe dans lesquelles les cellules microgliales assurent la phagocytose des cellules apoptotiques chez les nouveau-nés (Sierra et al., 2010). L'importance microgliale est donc permanente dans le remodelage cérébral tout au long de la vie.

L'édification du SNC est un bon exemple. Les cellules microgliales sont très importantes dans la formation des neurones fonctionnels. En fait, l'apparition des cellules microgliales est indissociable de celle des neurones, avant même la génération des astrocytes et des oligodendrocytes. Au cours de la neurogenèse, les cellules microgliales sont les premières cellules gliales migrant dans le SNC. Elles vont guider les neurones migratoires et limiter la croissance axonale (Li & Barres, 2017). De plus, elles élimineront les cellules souches neuronales apoptotiques ou excédentaires qui sont générées pendant la neurogenèse. Ce processus s'opère via le récepteur tyrosine kinase TAM qui engloutit les cellules apoptotiques opsoninées par Gas6 et la protéine S (Figure 6) (Colonna & Butovsky, 2017). Le contrôle de la microglie sur les neurones se poursuit au cours de l'élagage des synapses, primordial dans le remodelage des réseaux neuronaux chez l'embryon (Li & Barres, 2017; Silvin & Ginhoux, 2018).

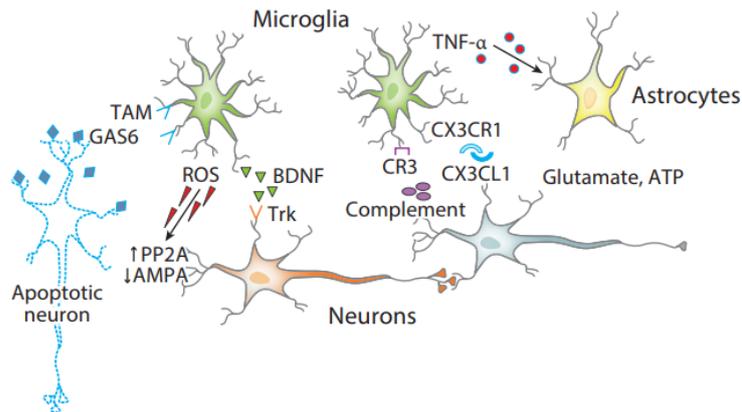


Figure 6: Régulation des réseaux neuronaux et des fonctions par la microglie. La microglie engloutit les neurones apoptotiques via reconnaissance de TAM médiée par le récepteur des neurones opsonisés par GAS6. Microglie contrôle la plasticité synaptique à travers la sécrétion de ROS, qui régulent négativement les récepteurs AMPA, et de BDNF, qui engage les récepteurs Trk qui moduler les activités de diverses synapses. La microglie peut éliminer les synapses qui sont marquées par le complément, ainsi via les interactions CX3CR1-CX3CL1. Enfin, la microglie peut affecter indirectement l'activité neuronale via les astrocytes, qui libèrent du glutamate et de l'ATP en réponse au TNF- α libéré par la microglie. Abréviations: BDNF, facteur neurotrophique dérivé du cerveau; Récepteurs TAM, Tyro3 et Axl et Mertk; GAS6, arrêt de croissance spécifique 6; ROS, espèces réactives de l'oxygène; AMPA, récepteur de l'acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique; PP2A, protéine phosphatase 2A; Trk, récepteur neurotrophique tyrosine kinase (Colonna & Butovsky, 2017).

2.3.7.2. « Synaptic pruning » ou Elagage synaptique

Les synapses aberrantes sont éliminées par les cellules microgliales phagocytaires, tandis que les synapses restantes sont renforcées pour former la connectivité adulte (R. C. Paolicelli et al., 2011). L'élimination des synapses non fonctionnelles dans le développement est essentielle à la bonne formation du réseau neuronal. Ce processus est conduit par les protéines du complément, une voie de signalisation immunitaire robuste qui marque les débris ou les agents pathogènes en vue de leur élimination par les cellules microgliales (Stevens et al., 2007). Au cours du développement, les protéines du complément C1q et C3 neuronales se localisent aux synapses (Figure 6). La microglie exposant à sa surface les récepteurs adaptés à ces facteurs du complément sera recrutée pour éliminer ces synapses, aidant à former les réseaux synaptiques définitifs (Schafer et al., 2012). Les astrocytes interviennent en réalité comme troisième acteur cellulaire dans l'élagage synaptique en sécrétant du TGF- β , qui initie le processus en induisant dans les neurones l'expression de C1q et C3 (Bialas & Stevens, 2013). Cela illustre la collaboration directe et intime entre les astrocytes, les neurones et la microglie pour la maturation synaptique et la survie neuronale (Tremblay et al., 2010). D'autres signalisations moléculaires interviendraient. La

reconnaissance CX3CR1-CX3CL1 a également été suggéré pour réguler la taille de la synapse par la microglie (R. C. Paolicelli et al., 2011).

Dans le développement post-natal du cerveau, la microglie stimule également la différenciation des oligodendrocytes et peut phagocyter les débris de myéline pour éviter d'exacerber l'état neuro-inflammatoire (Li & Barres, 2017). Elle reste aussi très importante dans la maturation synaptique et la survie neuronale par la libération de molécules sécrétées, incluant dérivés oxygénés, cytokines pro-inflammatoires et facteurs neurotrophiques. Par exemple, les neurones libèrent du glutamate et activent les récepteurs NMDA microgliaux. Les cellules microgliales activent la NADPH oxydase et libèrent des dérivés oxygénés (ROS). Leur reconnaissance par les neurones induit la sérine/thréonine protéine phosphatase 2A (PP2A), favorisant l'internalisation de récepteurs AMPA et affaiblissant ainsi la transmission synaptique médiée par ces récepteurs (Figure 6) (Colonna & Butovsky, 2017). Cette même cascade ROS-PP2A-AMPA est activée en cas d'hypoxie et conduit également à diminuer l'efficacité synaptique. Des cytokines pro-inflammatoires de la microglie peuvent également réguler les synapses de façon indirecte par les astrocytes. Le TNF- α microglial active le son récepteur TNFRI sur les astrocytes qui libèrent ensuite de l'ATP et du glutamate. Ces médiateurs activent les récepteurs présynaptiques sur les neurones et élèvent le courant synaptique (Figure 6). Enfin, la plasticité synaptique est contrôlée directement par la sécrétion microgliale de facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF) (Figure 6).

Dans un contexte pathologique de maladies neurodégénératives, l'équilibre fragile entre les cellules microgliales et leur microenvironnement change. Concernant sa contribution à la maturation synaptique précédemment décrite, l'examen du tissu cérébral adulte humain révèle en condition neurodégénérative une forte induction de la cascade du complément (Stephan et al., 2012). Des données obtenues à partir de souris porteuses de la mutation tau humaine montrent une activation microgliale et la perte exacerbée de synapses, suggérant qu'une inhibition du complément pourrait limiter la tauopathie dans ce modèle (Aguzzi et al., 2013). Dans des modèles murins d'Alzheimer, cette induction peut induire en effet un marquage aberrant de synapses, causant ainsi leur perte précoce. Cette voie est de ce fait une cible thérapeutique

potentielle en réponse aux problèmes de dysfonctionnement synaptique et de perte de mémoire (Hong et al., 2016). Il en est de même concernant la reconnaissance CX3CR1-CX3CL1 impliquée dans la taille des neurites. Une mauvaise information entraînerait une baisse de la taille synaptique et pourrait contribuer à des troubles neurodéveloppementaux et neuropsychiatriques (Zhan et al., 2014).

Ces mécanismes pathologiques posent également la question du rôle microglial dans la pathogenèse. Ces cellules répondent-elles toujours à des signaux externes pour élever en conséquence l'état inflammatoire ou sont-elles parfois la cause première de ces troubles ?

Comme cela a déjà été évoqué précédemment, si les fonctions microgliales sont centrales dans l'intégrité du tissu nerveux, leur dysfonctionnement pathologique ou la baisse de leurs activités due au vieillissement sont autant de facteurs de neurodégénérescence amenant à des troubles du développement neurologique, du comportement et de la mémoire (Figure 7) (Prinz et al., 2017; Zhan et al., 2014).

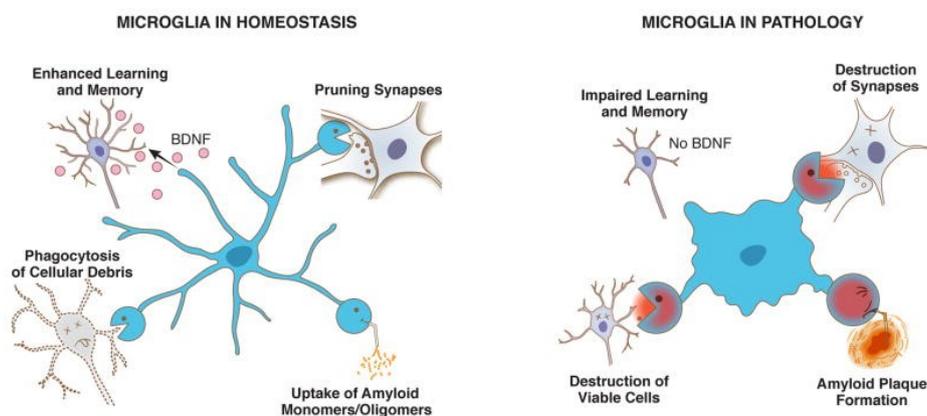


Figure 7: Disfonctionnement de cellules microgliales dans leur rôle vers les neurones. Gauche: le rôle neuro-support de la microglie médié par la sécrétion de facteurs trophiques, tels que le BDNF (facteur neurotrophique dérivé du cerveau) et la participation à l'élagage synaptique dans l'étape du développement normal. Leur activité phagocytaire est cruciale pour le nettoyage des cellules sénescents et des débris et pour ralentir l'effet toxique de l'amyloïde- β . A droite: disfonctionnements de la microglie, le SNC perd un facilitateur essentiel de la fonction synaptique neuronale. Les interactions avec les neurones favorisent la plasticité, mais une activité aberrante peut favoriser des réactions inflammatoires intenses entraînant une pathologie du SNC. La poursuite phagocytaire diminue avec l'âge et peut favoriser la progression de la pathologie et conduire à une régression cognitive (Herz et al., 2017).

Ce comportement anormal pourrait être partiellement corrigé par la reconstitution du compartiment myéloïde avec des progéniteurs sains dérivés de la moelle osseuse (Prinz et al., 2017). Ces caractéristiques montrent que la microglie est essentielle au

bon fonctionnement neuronal et confirment la capacité des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse à pouvoir compléter le pool microglial dans des conditions pathologiques.

3. Les macrophages du SNC

En condition physiologique, les macrophages du SNC sont les homologues non parenchymateux de la microglie. Ils sont divisés en différents sous-types : les macrophages périvasculaires (MPV), macrophages méningés (MM) et les macrophages des plexus choroïdes (MPC) en raison de leur localisation (Figure 8) (Li & Barres, 2017).

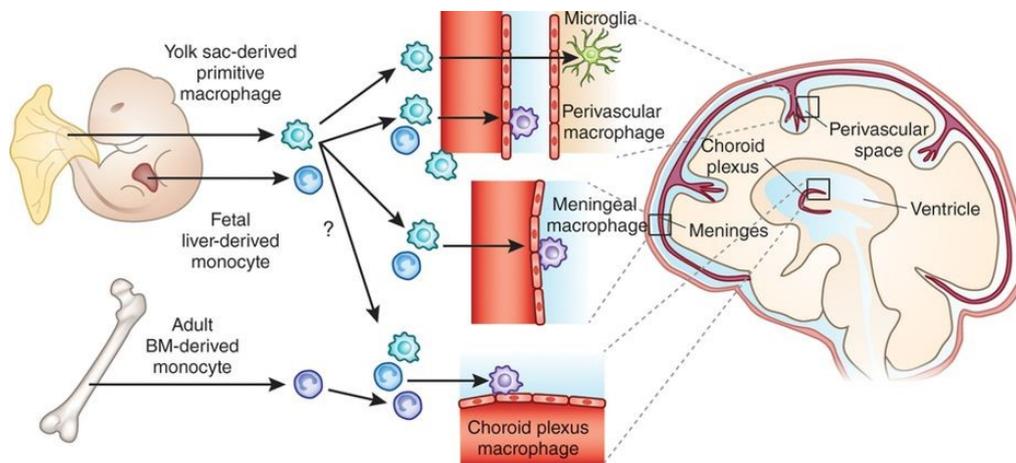


Figure 8: Origine et localisation de cellules microgliales et des macrophages du SNC. Les microglies adultes proviennent exclusivement des macrophages du sac vitellin. Les macrophages résidant dans l'espace périvasculaire et les méninges sont issus de précurseurs embryonnaires, très probablement de macrophages du sac vitellin, avec une contribution potentielle des monocytes fœtaux. Les macrophages du plexus choroïde ont une origine hétérogène englobant les monocytes de BM adultes et les cellules précurseurs embryonnaires (Greter, 2016).

De la même façon que les cellules microgliales, les macrophages périvasculaires et méningées sont originaires des précurseurs du sac vitellin, alors que les macrophages des plexus choroïdes ont deux origines, embryonnaire et adulte (Li & Barres, 2017). Des études récentes éclairent sur leurs rôles dans le cerveau. Ils semblent jouer un rôle important dans l'élimination des débris et des cellules en apoptose (Herz et al., 2017). Les macrophages périvasculaires sont des acteurs importants dans la prévention de la neurodégénérescence en contribuant à l'élimination des peptides amyloïdes β (Aguzzi et al., 2013). Ils préservent les cellules endothéliales, favorisent la stabilité capillaire, régulent la résistance vasculaire et maintiennent l'intégrité de la barrière

hématoencéphalique (Herz et al., 2017). Les macrophages des plexus choroïdes produisent les deux tiers du liquide céphalo-rachidien (LCR). Ils sont considérés comme des régulateurs de la neuro-inflammation. Les macrophages méningés, par leur position sous-durale, examinent le liquide céphalo-rachidien et préviennent d'infections et de lésions tissulaires. Ils sont particulièrement sensibles à leur environnement et peuvent acquérir des propriétés pro- ou anti-inflammatoires (Herz et al., 2017). Les signatures moléculaires de surface permettent d'utiliser des marqueurs pour différencier les macrophages du SNC des cellules microgliales (Prinz et al., 2017).

Le SNC contient également un vaste réseau vasculaire, dans lequel résident d'autres cellules myéloïdes telles que les cellules dendritiques, les monocytes, et les polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles, basophiles), en plus des lymphocytes. Au cours d'épisodes de lésion traumatique, ces cellules peuvent avoir une influence délétère (Li & Barres, 2017). En condition normale, la barrière hématoencéphalique ou BHE assure l'étanchéité du tissu nerveux vis-à-vis des capillaires sanguins. La BHE est une structure dynamique composée d'une couche de cellules endothéliales (les cellules sont étroitement liées par des jonctions serrées), d'une lame basale endothéliale, d'un espace périvasculaire avec des macrophages périvasculaires. Elle implique aussi les astrocytes, du côté parenchymateux, qui contrôlent la perméabilité aux cellules et aux molécules issues de la circulation sanguine (Prinz & Priller, 2017). De ce fait, lors d'une rupture de la BHE, le passage des molécules et des cellules depuis le sang vers le tissu nerveux causeront un dysfonctionnement des cellules nerveuses.

Les cellules microgliales réagissent rapidement en dirigeant leurs ramifications vers la lésion en cas des perturbations homéostatiques minimales, par exemple des petites lésions vasculaires ou tissulaires. Les cellules microgliales sont en mesure de limiter d'autres dommages et de restaurer l'homéostasie normale. En conséquence, les activations locales et transitoires n'entraînent aucun symptôme (Hanisch & Kettenmann, 2007). Dans des cas de blessures impliquant une rupture de la barrière hématoencéphalique, les monocytes Ly6C^{hi} du sang peuvent infiltrer le parenchyme cérébral et se différencier en cellules ressemblant à des cellules microgliales. Ces cellules vont se mélanger aux cellules microgliales résidentes et intervenir dans l'inflammation du

tissu nerveux (Prinz & Priller, 2014). Si elles ne sont pas mises en avant dans la pathogenèse des maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer ou Parkinson, ces pertes d'étanchéité de la BHE sont le facteur déclenchant de la sclérose multiple. La présence et la gravité de la perturbation de la BHE déterminent quelles cellules immunitaires circulantes accèderont au cerveau malade faisant ainsi varier l'étendue des lésions tissulaires et les séquelles cliniques (Prinz & Priller, 2017).

C. La sangsue *Hirudo medicinalis*

La sangsue *Hirudo Medicinalis* est un invertébré annélide d'eau douce. Elle appartient au groupe des hirudinées. Son utilisation comme dispositif médical connaît un regain d'intérêt depuis quelques années. Elle est utilisée par application sur des zones obstruées du système veineux mais aussi après une opération reconstructive pour restaurer le flux sanguin (Sig, Guney, Uskudar Guclu, & Ozmen, 2017; Iain S Whitaker, Izadi, & Allen, 2007; I S Whitaker, Izadi, Oliver, Monteath, & Butler, n.d.). En effet, cet animal reconnu et agréé par l'agence américaine du médicament (FDA) est capable d'absorber le sang veineux accumulé à la cicatrice. De plus, sa salive est libérée avant toute ingestion et contient de nombreux vasodilatateurs, des agents anticoagulants ainsi que des molécules anti-inflammatoires (Hildebrandt & Lemke, 2011). Ces propriétés salivaires ont été développées naturellement pour se prémunir d'une réaction de coagulation et d'une réaction inflammatoire dans son propre système digestif après repas. Elles sont ici réutilisées à bon escient pour nettoyer les zones cicatricielles, ce qui accélère la reconstruction des tissus et permet même la réparation des terminaisons nerveuses les plus fines.

La sangsue *Hirudo Medicinalis* est également importante pour son utilisation en recherche. Elle a depuis longtemps été utilisée en tant que modèle expérimental en neurosciences. Son système nerveux est décrit depuis quelques décennies (Coggeshall & Fawcett, 1964) mais avait déjà fait l'objet de marquages histologiques dû à la grande taille de ses neurones. Initialement dessiné par Gustav Retzius, neuro-histologiste suédois (1891), le système nerveux de la sangsue médicinale a ensuite servi de modèle expérimental. En effet, les travaux de Kuffler, l'un des pères des neurosciences modernes, y ont étudié les propriétés des cellules gliales (Kuffler & Potter, 1964). Ces

études ont contribué progressivement à la découverte des propriétés électrophysiologiques des cellules nerveuses chez les vertébrés (Ransom & Sontheimer, 1992). Les travaux d'électrophysiologie sur ce système nerveux ont également permis d'établir une cartographie très précise des cellules nerveuses (Muller & Nicholls, 1974; Macagno, 1980; Muller & Scott, 1981). Enfin, autre fait marquant dans l'utilisation de la sangsue médicinale, son système nerveux a représenté un modèle intéressant pour l'identification des cellules microgliales. Pio del Rio-Hortega a notamment utilisé le SNC de la sangsue pour décrire historiquement les cellules microgliales en utilisant une coloration au carbonate d'argent (Rio-Hortega, 1920; Sieger & Peri, 2013). La sangsue est considérée comme le premier modèle de recherche sur les cellules microgliales (Sieger & Peri, 2013). Cet organisme présente la capacité de régénérer ses axones après une blessure avec une grande précision et de récupérer sa capacité locomotrice (von Bernhardt & Muller, 1995). C'est pourquoi, plusieurs études portant sur la régénération axonale ont été menées avec succès sur ce modèle (Elliot & Muller, 1982; Gao & Macagno, 1988; K J Muller & Scott, 1979, 1980).

1. Le système nerveux central chez la sangsue

Le SNC de la sangsue se situe, enfermé dans une capsule fibreuse, dans le sinus sanguin ventral. Il est constitué d'une série de ganglions cérébroïdes en arrière de la ventouse péribuccale (partie céphalique), puis de 21 ganglions segmentaires et finalement de sept ganglions caudaux fusionnés et innervant la ventouse postérieure. Les ganglions adjacents sont reliés les uns aux autres par deux tissus connectifs (Figure 9).

Environ 400 neurones sont localisés dans chaque ganglion nerveux dont la plupart vont projeter leur axone dans les tissus connectifs. Les cellules microgliales sont, elles, réparties de manière uniforme dans les ganglions (environ 10 000 par ganglion) et dans les connectifs (environ 2 000 par connectif) (Le Marrec-Croq et al., 2013). Il existe d'autres types de cellules dans ce SNC. Une cellule macrogliale par connectif entoure les axones, deux cellules gliales géantes sont localisées dans le neuropile et six cellules

gliales en paquets enveloppent les corps cellulaires des neurones dans chaque ganglion (Figure 9) (Le Marrec-Croq et al., 2013).

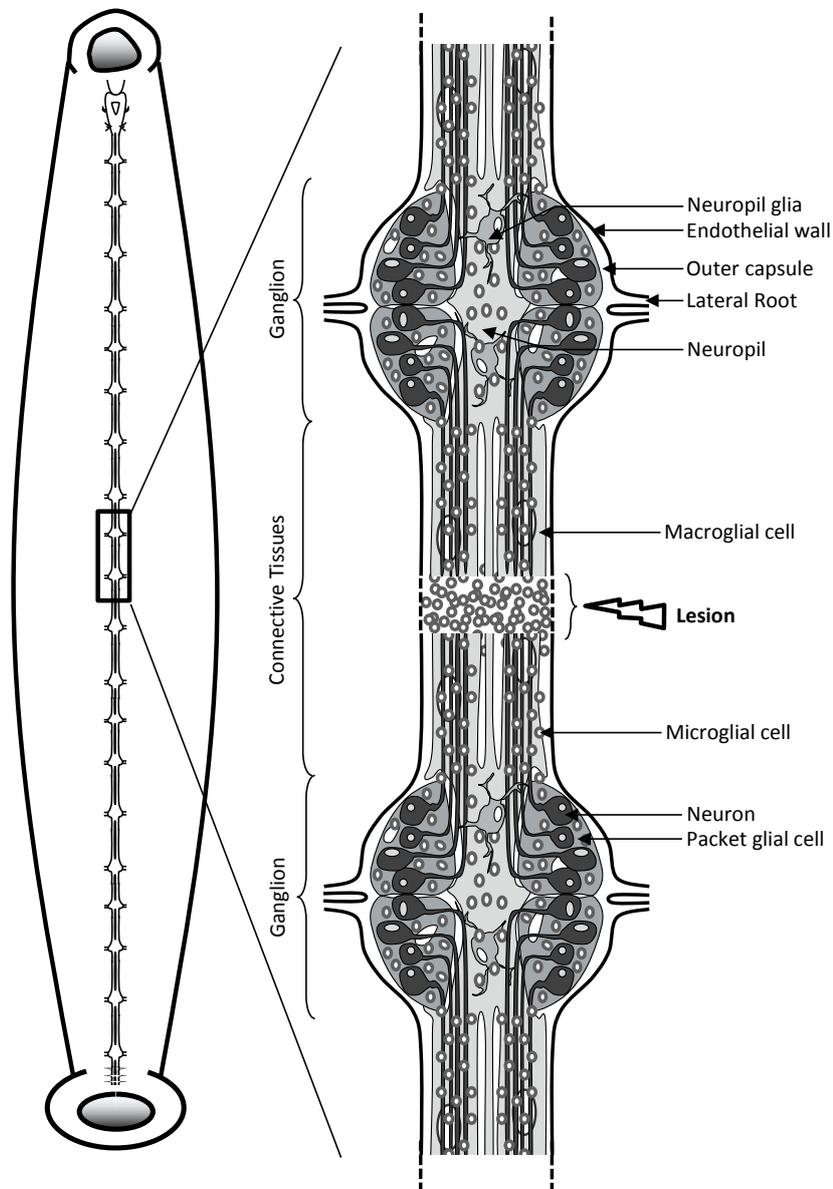


Figure 9: Schéma du système nerveux central chez *Hirudo medicinalis*. Le schéma de gauche montre la structure générale du système nerveux. Le schéma de droite montre un fragment de 2 ganglions nerveux présentant les deux tissus connectifs entre eux. La structure d'un ganglion se caractérise par les cellules gliales géantes du neuropile, par les cellules gliales en paquets (4 visibles sur les 6) enveloppant les corps cellulaires neuronaux et entourées de cellules microgliales. Les axones sont projetés à travers le neuropile jusque dans les connectifs. De même, il est représenté une lésion axonale et une accumulation consécutive de la microglie.

Grace à la simplicité de sa structure des études ont précisé la cartographie neuronale dans un ganglion nerveux type ainsi que leurs propriétés électrophysiologiques et la spécificité de leurs connexions synaptiques (Nicholls & Baylor, 1968; Stuart, 1970). Sur la base de ces données électrophysiologiques, les neurones sensoriels ont été divisés

en 3 groupes, les neurones tactiles (T), les neurones de pression (P) et les neurones nocicepteurs (N) (Nicholls & Baylor, 1968). Les motoneurons et les interneurons ont également été caractérisés (Stuart, 1970). Des études complémentaires ont même précisé les connectivités synaptiques, les neurotransmetteurs et les rôles comportementaux d'une majorité d'entre eux (K J Muller & Scott, 1979; Kenneth J. Muller & Carbonetto, 1979). La sangsue reste un modèle alternatif facile d'utilisation, avec un tissu nerveux accessible, et avec la capacité de pouvoir isoler rapidement les cellules microgliales et les neurones (Figure 10).



Figure 10: Prélèvement du SNC chez la sangsue. La chaîne nerveuse est située dans le sinus sanguin ventral. Elle est directement prélevée après ouverture du sinus (Image de gauche). Une fois extraite, la chaîne entière ou sous forme de fragments est épinglée dans une boîte dans un tampon PBS. Les ganglions sont faciles à observer tout comme les tissus connectifs (Image de droite).

Il n'existe pas de type cellulaire morphologiquement apparenté à des astrocytes et des oligodendrocytes, même si les cellules gliales décrites précédemment doivent probablement assurer certaines de leurs fonctions. Les axones sont dépourvus de myéline dont les débris chez les mammifères sont facteurs de pro-inflammation et inhibiteurs de repousse axonale (Geoffroy, 2011; Ineichen et al., 2017). Cette particularité ralentit l'influx nerveux mais pourrait constituer un environnement plus propice à la réparation nerveuse. Des études ont d'ailleurs démontré que les axones sont régénérés et rétablissent complètement leurs connexions synaptiques pour mener à une restauration complète des fonctions locomotrices, observables par un retour complet du comportement natatoire (von Bernhardt & Muller, 1995). Cette régénération axonale, a été démontrée *in vitro* et *in vivo* chez la sangsue. En effet, des études d'électrophysiologie et de comportement ont démontré *in vivo* que les

neurones sensoriels individuels sont capables suite à une lésion de développer de nouvelles connexions synaptiques de manière spécifique. Cette reconnexion synaptique, loin d'être un processus aléatoire, a été montrée comme un processus organisé de telle façon que les neurones lésés présentent une capacité de repousse axonale et de synaptogenèse leur permettant avec un degré élevé de spécificité de retrouver exactement les mêmes cellules initialement connectées (Baylor & Nicholls, 1971b; Jansen & Nicholls, 1972). Il a été démontré que quand le neurone cible est éliminé, l'axone se régénère normalement vers le site habituel de la synapse, sans former d'autres connexions (K J Muller & Scott, 1979; Kenneth J. Muller & Carbonetto, 1979).

1.1. Cellules microgliales

Dans un contexte de lésion expérimentale des axones, au milieu des tissus connectifs, les cellules microgliales sont les seules cellules capables de migrer au site de blessure. Des cellules sanguines sont recrutées autour du système nerveux en relation avec les cellules endothéliales superficielles mais ne pénètrent pas à l'intérieur de la capsule conjonctive (Boidin-Wichlacz et al., 2012). Ainsi, les cellules microgliales sont les seules cellules immunitaires en interaction étroite avec les neurones et les axones (Le Marrec-Croq et al., 2013).

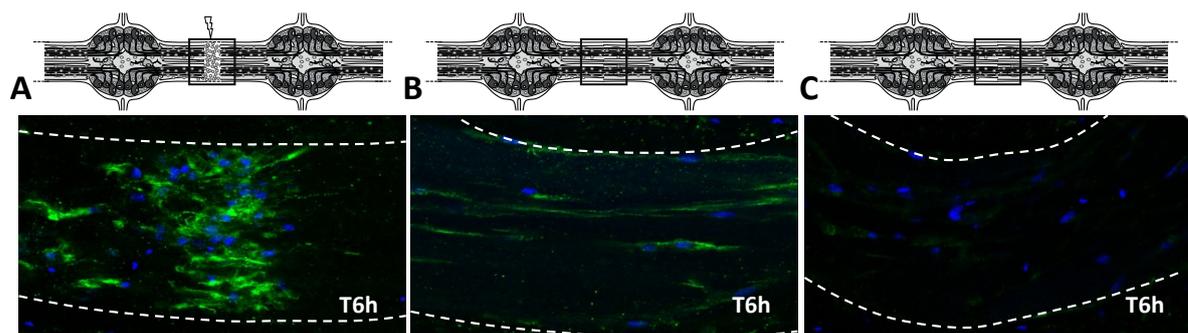


Figure 11: Immunodétection du marqueur microglial Iba1 dans des fragments de SNC. (A) Immunodétection par marquage fluorescent et sous microscopie confocale révélant l'accumulation microgliale au point de lésion 6 heures après la blessure. (B) La même immunodétection permet de constater la présence de peu de cellules microgliales sur la même zone non lésée. (C) Aucun signal n'a été détecté dans les tissus traités avec un anticorps secondaire seul comme contrôle négatif. Les noyaux cellulaires ont été révélés avec un marqueur nucléaire Hoechst 33342 (bleu).

En effet, les cellules microgliales peuvent être observées au point de lésion 6 heures après la blessure, à l'aide d'Iba1, marqueur typique de la microglie (Figure 11A). Ce

résultat montre que seules les cellules microgliales s'accumulent au point de la lésion. Par conséquent, chez la sangsue, il est possible de suivre les cellules microgliales *ex vivo* au cours de leur accumulation en utilisant un simple marqueur nucléaire.

De plus, les cellules microgliales sont également observables à l'aide de l'immunomarquage anti-Iba1 dans des conditions naïves sans aucune lésion (Figure 11B). Enfin, une étude faite au laboratoire a démontré que les cellules microgliales sont positives pour *hmlba1* et que ce signal augmente dans chaque cellule microgliale après une stimulation par ATP (Drago et al., 2014). Les travaux du laboratoire ont également montré que ces cellules sont aussi capables de phagocyter des bactéries rendues fluorescentes en très peu de temps (30 minutes) et ce jusqu'à 6h après la mise en présence avec les bactéries (Le Marrec-Croq et al., 2013).

Les cellules microgliales présentent un changement morphologique similaire à celles des mammifères. Très ramifiées à l'état basal, ce qui leur permet de sentir leur environnement, elles deviennent améboïdes à la suite d'une lésion. Dans cet état activé, elles rentrent en mouvement pour atteindre la zone de lésion (Figure 12).

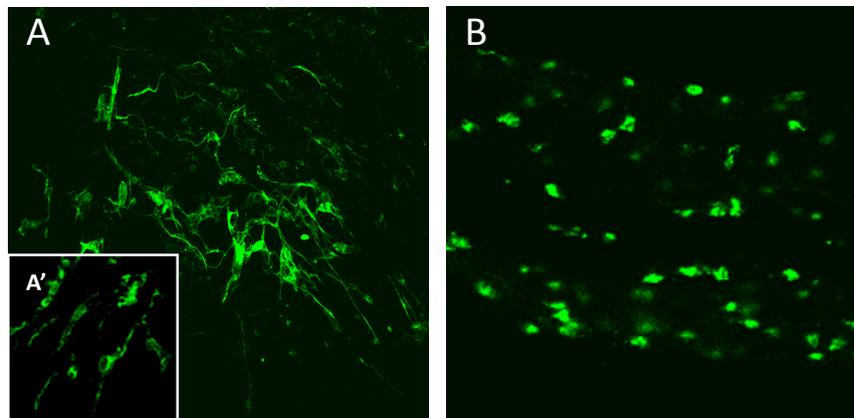


Figure 12: Immunodétection de la microglie par la gliarine dans des fragments de SNC. Immunodétection par marquage fluorescent et sous microscopie confocale révélant des morphologies différentes dans un condition basale (A) et 6 heures post-lésion (B).

Faciles à prélever après ouverture de la chaîne nerveuse, ces cellules sont remises en culture primaire en grand nombre et sans manipulations chimiques et mécaniques trop longues. Leur prélèvement et leur maintien en cultures primaires à température ambiante et sans apport de CO₂ en font un atout intéressant comme modèle microglial. Enfin, seules cellules recrutées à la lésion, leur observation est possible par

l'utilisation de marqueurs nucléaires à la fois *in vivo*, dans la chaîne nerveuse entière mais aussi sur des fragments de chaîne lésée maintenus en culture *ex vivo*.

1.2. Recrutement de cellules microgliales

Dans un contexte de lésion expérimentale des axones, au milieu des tissus connectifs, les cellules microgliales s'accumulent au point de la lésion. Aucun recrutement microglial n'est observé dans les autres connectifs ou ganglions adjacents et non lésés. Ce déplacement, et non une prolifération à la lésion, correspond à une véritable disparition des cellules microgliales dans les autres zones des connectifs (Figure 13).

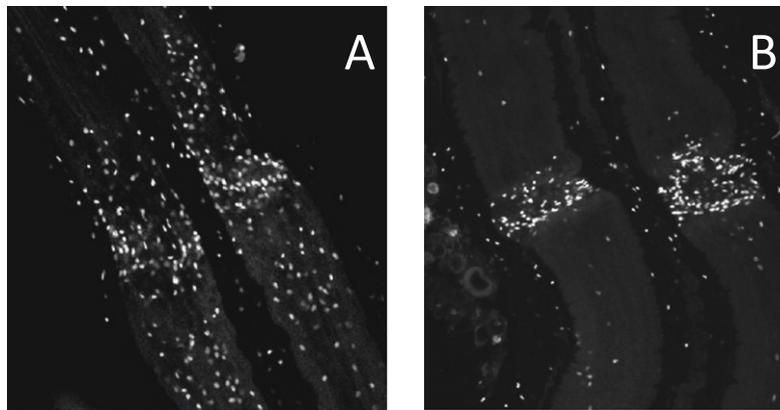


Figure 13: Observation de l'accumulation des cellules microgliales à partir d'un segment de connectifs après lésion. Les noyaux des cellules microgliales (blanc) ont été marqués avec un colorant fluorescent du noyau (Hoechst) pour observer l'accumulation de la microglie après l'écrasement des connectifs. (A) Six heures après une lésion, les cellules microgliales migrent progressivement vers le site de la lésion. (B) Plus tard, 24 heures après l'écrasement, les cellules microgliales sont principalement recrutées à la lésion. L'observation ici d'un seul plan focal ne permet de visualiser la totalité des cellules microgliales recrutées.

Des études menées sur les mécanismes de régénération axonale ont cherché à comprendre les rôles et *in fine* l'importance des cellules gliales. Il a été montré que lorsque des cellules gliales géantes ou macroglie sont endommagées, la capacité de l'axone endommagé à repousser et se reconnecter avec sa cible spécifique n'est pas altérée (Elliot & Muller, 1982). Par contre, une altération dans le recrutement de cellules microgliales au point de la lésion axonale entrainera en effet un retard important de la repousse axonale (Ngu, Sahley, & Muller, 2007). C'est pourquoi, cette accumulation est considérée comme essentielle à la repousse des axones lésés afin de mener à une réparation nerveuse fonctionnelle.

Plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes de migration des cellules microgliales vers le site de la lésion. Ces études ont montré que la microglie migre et s'accumule au cours du temps, en augmentant progressivement le nombre de cellules accumulées à la lésion jusqu'à 24h post-lésion (McGlade-McCulloh, Morrissey, Norona, & Muller, 1989; Morgese, Elliott, & Muller, 1983) (Figure 13). Certaines études ont démontré la cinétique de recrutement des cellules microgliales dans un fragment isolé du SNC maintenu en culture, dans lequel les noyaux des microglies sont révélés par un intercalant de l'ADN. L'observation par microscopie montre un déplacement dès les premières minutes après la lésion ainsi qu'une accumulation au site de la lésion dans les 2 heures suivantes. Il a été montré que les cellules microgliales ne migrent pas uniformément et que des sous-populations se déplacent en permanence à une vitesse maximale de 7 μm par minute (McGlade-McCulloh et al., 1989).

De la même façon que chez les mammifères, la migration des cellules microgliales est précédée d'un changement morphologique. Les cellules microgliales contractent leurs ramifications, et adopte une morphologie amiboïde (Croq et al., 2010; F. Drago et al., 2014). Une fois recrutées au point de la lésion, les cellules microgliales développent de nouveau leurs ramifications progressivement. Des études *in-vitro* ont démontré que lorsque les microglies sont cultivées avec du milieu conditionné par des fragments de SNC lésés, elles développent leur ramifications et stimulent plus fortement la croissance neuritique (von Bernhardt & Muller, 1995).

De plus, pour comprendre le recrutement microglial, plusieurs études se sont intéressées aux molécules qui permettent leur migration vers le site de la lésion (Arafah et al., 2013; Croq et al., 2010; Le Marrec-Croq et al., 2014; Schikorski et al., 2009; Tahtouh et al., 2009, 2012). Parmi les molécules impliquées dans le recrutement microglial, le monoxyde d'azote (NO) semble intervenir comme médiateur diffusible (Arafah et al., 2013). La présence de NO synthase à la lésion suggère également une forte implication de ce médiateur dans l'accumulation de cellules microgliales (A. Chen, Kumar, Sahley, & Muller, 2000; Shafer, Chen, Kumar, Muller, & Sahley, 1998). Il a d'ailleurs été démontré qu'une inhibition ou une augmentation exagérée de NO entraînent une diminution de l'accumulation microgliale (A. Chen et al., 2000). Ces résultats suggèrent que le NO aurait un rôle dans le recrutement microglial mais agirait

également comme un signal « stop » pour stabiliser leur déplacement sur le site (A. Chen et al., 2000). Un autre médiateur diffusible, l'ATP, permet un mouvement maximal de la microglie dans les SNC de la sangsue. A partir de fragments de chaîne nerveuse lésée, un traitement utilisant un antagoniste des récepteurs purinergiques (récepteur de l'ATP) ralentit les mouvements des cellules microgliales, sans aucune influence sur leur direction. A l'inverse, un traitement utilisant un absorbeur de NO déclenche un mouvement mal organisé des cellules microgliales (Duan, Sahley, & Muller, 2009). Toutes ces expériences soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'ATP libéré directement ou indirectement par une blessure activerait la migration microgliale alors que le NO serait responsable de l'organisation directionnelle de ce déplacement vers la lésion (Duan et al., 2009). De façon intéressante, afin de préciser ce type de mécanisme, d'autres travaux ont montré que de faibles concentrations d'ATP (1mM) attirent la microglie alors que de fortes concentrations d'ATP (3mM) peuvent retarder l'accumulation (Ngu et al., 2007). Dans ce contexte de retardement microglial, il a été observé que la repousse axonale est également affectée ce qui démontre que le recrutement de la microglie est crucial pour le déclenchement du processus de régénération axonale (Ngu et al., 2007).

Grâce à la création d'un consortium de laboratoires, il a été possible de réaliser la construction de banques d'ADNc issues du système nerveux de sangsue (Macagno et al., 2010). Par la suite, ce consortium a financé le séquençage du génome de ce modèle. Au final, l'obtention de banques de données moléculaires a considérablement aidé dans la recherche de molécules homologues aux facteurs chimiotactiques déjà connus chez d'autres organismes. Des travaux menés au laboratoire ont ainsi permis de mettre en évidence certains des facteurs chimiotactiques responsables du recrutement microglial chez la sangsue. La molécule homologue au polypeptide activant les monocytes endothéliaux II (EMAPII) a été caractérisée chez la sangsue. Chez les mammifères, EMAP II, une cytokine pro-inflammatoire, est fortement produit dans la microglie activée du cerveau lésé et attire les cellules microgliales au site de lésion, suggérant ainsi son implication dans les pathologies inflammatoires (Mueller, Schluesener, Conrad, Meyermann, & Schwab, 2003). Cette molécule *hmEMAPII* (pour *Hirudo Medicinalis* EMAPII) agirait de la même manière chez la sangsue en

reconnaissant une structure analogue à son récepteur CXCR3 (Schikorski et al., 2009). Il a été également montré que le gène codant cette cytokine est sous le contrôle d'une signalisation TLR dépendante (Schikorski et al., 2009).

L'interleukine 16 (IL-16) a été aussi caractérisée chez la sangsue. Chez les mammifères, l'IL-16 est une cytokine pro-inflammatoire libérée notamment par la microglie et les lymphocytes pour attirer majoritairement les lymphocytes CD4+ via son récepteur naturel, CD4, au travers de la BHE. Il a été suggéré dans la sclérose multiple que l'augmentation de l'IL16 peut avoir un lien avec la régulation de l'inflammation et de l'endommagement axonal (Skundric, Cruikshank, & Drulovic, 2015). Dans ce contexte chez la sangsue, la molécule *hmIL-16* est produite par les neurones après une lésion pour attirer la microglie sur le site de blessure (Croq et al., 2010). De manière intéressante, il a été démontré que la molécule de sangsue *hmIL-16* est capable d'exercer le même effet chimiotactique sur les lymphocytes T CD4+ humain, ce qui suggère la présence dans le SNC de la sangsue d'un récepteur similaire à celui utilisé chez les mammifères. Cette hypothèse d'un récepteur très proche est confirmée par le fait que les cellules microgliales de sangsue sont également attirées par la molécule IL-16 humaine (Croq et al., 2010). Les résultats indiquent que *hmIL-16* (appelée simplement IL-16 pour la suite) pourrait donc agir via un récepteur apparenté à CD4 sur les cellules microgliales de sangsue.

Chez notre modèle, les travaux du laboratoire ont également abouti à la mise en évidence d'un facteur du complément, C1q, dans le recrutement de la microglie. Comme nous l'avons évoqué précédemment, la molécule C1q joue un rôle important dans le recrutement microglial à l'état embryonnaire et intervient dans le phénomène d'élagage synaptique (synaptic pruning) (Bialas & Stevens, 2013; Stephan et al., 2012; Stevens et al., 2007). Son implication dans le recrutement microglial chez un mammifère adulte a été mise en évidence en même temps que celle réalisée chez la sangsue (Färber et al., 2009; Tahtouh et al., 2009). La molécule *hmC1q* est produite pas les neurones. Son action chimiotactique est corrélée au NO qui, lorsqu'il est bloqué, supprime partiellement le recrutement microglial *in vitro* (Tahtouh et al., 2009). Ensuite, les récepteurs de cette molécule *hmC1q* ont été caractérisés. Il a été démontré que le récepteur gC1qR (ou C1qBP) est impliqué dans le chimiotactisme

dépendant de HmC1q (Tahtouh et al., 2012). Ce récepteur n'est présent que dans une sous-population *hmC1qBP⁺*, ce qui suggère que toutes les cellules microgliales ne sont pas réactives aux mêmes molécules chimioattractantes dans le processus de recrutement à la lésion. Enfin, l'implication d'un second partenaire, cC1qR ou calréticuline (*hmCaIR*) chez la sangsue a été mis en évidence dans le mécanisme de recrutement microglial dépendant *hmC1q* (Le Marrec-Croq et al., 2014).

Même si plusieurs molécules chimiotactiques ont été identifiées jusqu'à maintenant, des études supplémentaires pourront compléter cet état de connaissance et permettront de mieux comprendre les mécanismes chimiotactiques chronologiques conduisant le recrutement de vagues successives de cellules microgliales à la lésion.

1.3. Dialogue entre microglie et neurones après une lésion

La sangsue est un modèle d'étude qui se veut complémentaire aux autres modèles animaux en ce sens que les mécanismes de dialogue entre populations cellulaires reposent d'abord sur des signalisations moléculaires. La mise en évidence, chez cet organisme, de mécanismes moléculaires présentant d'importantes homologues avec ceux mis en jeu chez les mammifères permet d'établir une vision translationnelle dont le simple objectif est d'apporter des éléments de compréhension supplémentaires. Si les modèles mammifères offrent de très nombreux outils d'invalidation génique, des lignées cellulaires et l'avantage d'une communauté très importante de chercheurs, l'utilisation de modèles différents peut aussi apporter quelques atouts.

Le dialogue entre microglie et neurones dans le SNC de la sangsue est avant tout basé sur un tissu très accessible et observable *in vivo* comme *ex vivo* par microscopie en temps réel. A l'image de la larve du poisson zèbre par exemple, ce modèle permet encore de concevoir des expériences dans les tissus vivants. De façon intéressante, les cellules microgliales sont également sensibles à leur microenvironnement (Lavin et al., 2014). Il est alors possible de croire que les cellules microgliales n'auront pas le même dialogue avec les extrémités axonales lésées et avec les corps cellulaires neuronaux. Toutefois, la compréhension d'un tel dialogue chez des modèles mammifères se heurte à la complexité des tissus (Zeng & Sanes, 2017). La sangsue se prête bien à ce

type d'étude car la structure tubulaire de son système nerveux et l'architecture des neurones positionnés en long sont particulièrement avantageux. Les corps cellulaires neuronaux sont en effet exclusivement ganglionnaires et les axones sont localisés dans les connectifs. Une lésion spécifique au milieu des connectifs n'endommagerait que les axones, tout en gardant intacts les corps cellulaires neuronaux. La survie neuronale n'étant pas compromise, il est possible d'étudier les mécanismes conduisant à la repousse axonale et à la synaptogenèse chez ce modèle. Dans ce contexte, l'utilisation de la chaîne nerveuse d'*Hirudo* est conçue comme la possibilité d'apporter un éclairage nouveau sur les mécanismes de dialogue entre les neurones et la microglie et *in fine* de vérifier leur conservation chez les mammifères.

D. Voie de la signalisation de la famille TGF- β

La voie de signalisation de la famille TGF- β est largement étudiée dans des conditions physiologiques ou pathologiques. La superfamille TGF- β est constituée de membres impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire depuis le développement embryonnaire jusqu'à l'homéostasie et la régénération des tissus chez l'adulte (Ramachandran et al., 2018). La voie du TGF- β a été décrite très largement dans le règne animal chez les mammifères mais aussi chez les amphibiens (*Xenopus laevis*), les insectes (*Drosophila melanogaster*) et les nématodes (*Caenorhabditis elegans*) (Huminiński et al., 2009).

La superfamille est formée par plus de 30 protéines structurellement apparentées, telles que les différents TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3), les activines, les inhibines, les GDFs (Growth Differentiation Factors), les GDNFs (Glial-derived Neurotrophic Factors), les BMPs (Bone Morphogenic Proteins), l'AMH (Anti-Müllerian Hormone), et Nodals (Hyytiäinen, Penttinen, & Keski-Oja, 2004). Les membres de la famille TGF- β sont synthétisés sous forme d'une molécule précurseur constituée d'un peptide signal dans sa région amino-terminale, d'une région centrale appelée LAP (pour Latency-Associated Peptide), et d'une région carboxy-terminale constituant la forme mature bioactive (Figure 14). Le précurseur pro-TGF- β est sous la forme d'un homodimère par la présence de six cystéines pouvant former trois ponts disulfures afin de consolider la structure. La dimérisation du TGF- β nécessite une septième cystéine dans la région

active formant un pont disulfure reliant les deux monomères. Il est ensuite clivé entre la région LAP et la région active par une endopeptidase dans l'appareil de Golgi pour former le petit complexe latent (SLC). Ce complexe est composé d'un dimère de la forme LAP en interaction non covalente avec le dimère de TGF- β actif. Dans la plupart des cellules, la forme latente du TGF- β , ou LTGF- β , associera le SLC de façon covalente à la protéine LTBP (LTGF- β -binding protein) formant ainsi un large complexe latent (LLC pour Large Latent Complex) (Hyytiäinen et al., 2004).

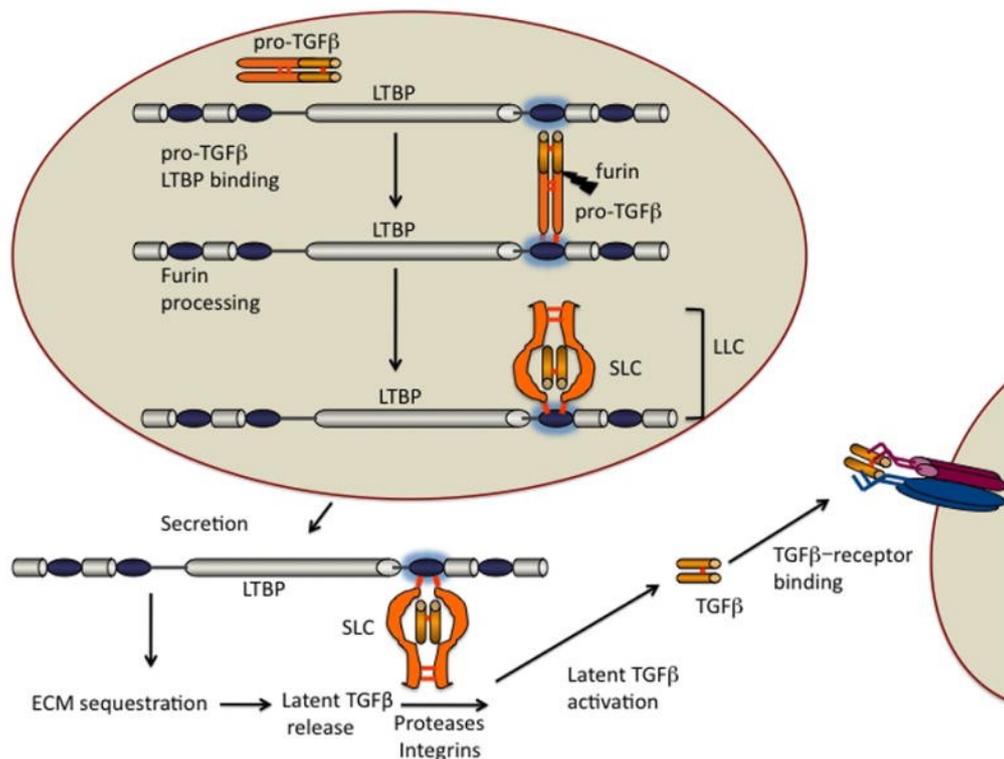


Figure 14: Représentation schématique de la maturation du TGF- β . Les cellules produisent du TGF- β sous forme de complexe inactif et sa production est un processus en plusieurs étapes. Le TGF- β est synthétisé sous forme de molécule précurseur constituée du facteur de croissance mature C-terminal et du LAP. Le clivage protéolytique se produit par une enzyme de type furine qui sépare le TGF- β mature de sa séquence propeptidique LAP. Le TGF- β reste lié de manière non covalente au LAP et forme le un petit complexe latent (SLC). La plupart des cellules sécrètent le TGF- β sous forme de grand complexe latent (LLC) qui a ensuite été incorporée à la matrice extracellulaire (MEC). Le TGF- β latent séquestré peut être libéré de sa localisation dans la MEC par divers mécanismes d'activation à médiation cellulaire (Todorovic & Rifkin, 2012).

Une fois libéré, les peptides LAPs du LLC confèrent la latence du complexe alors que les LTBP permettent la fixation du TGF- β à la matrice extracellulaire et ainsi son stockage (Todorovic & Rifkin, 2012). Le TGF- β mature actif sera libéré après un changement de conformation induit soit par un clivage protéolytique des LAPs, soit par des interactions physiques des LAPs avec d'autres protéines (ex : thrombospondine-1). Cet

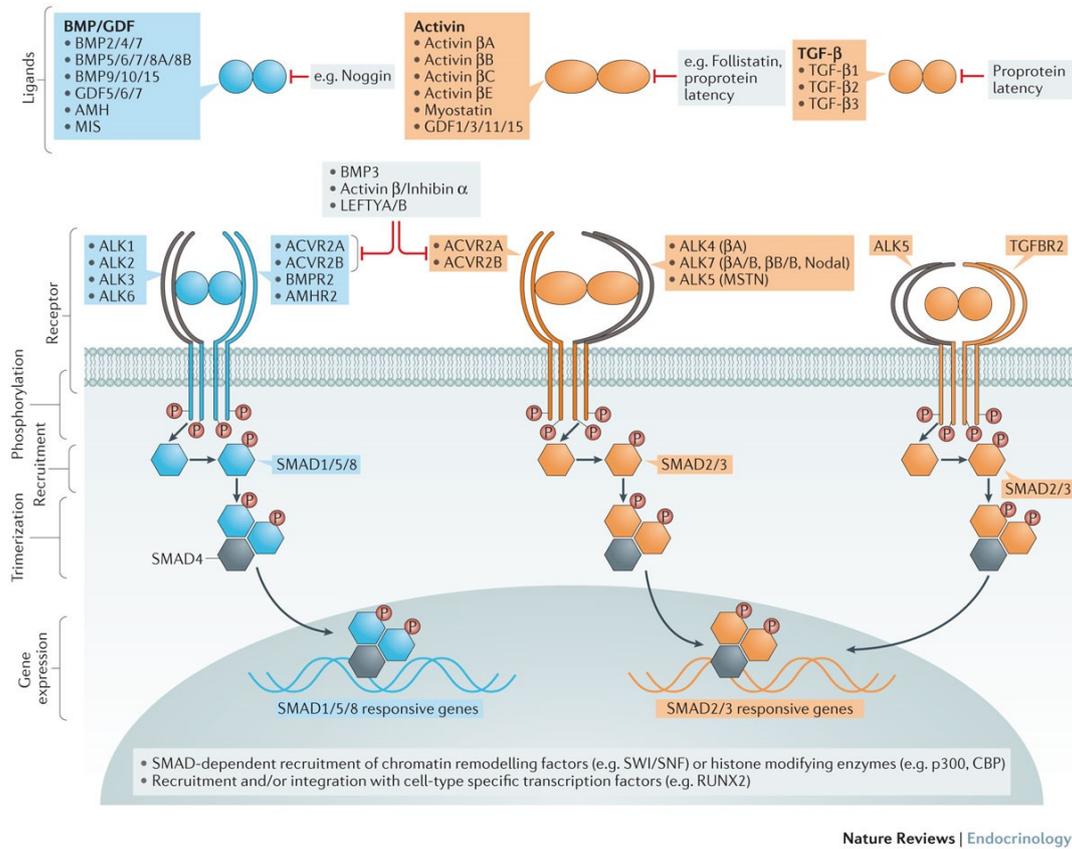
homodimère TGF- β actif pourra interagir avec ses récepteurs spécifiques (Tandon, Tovey, Sharma, Gupta, & Mohan, 2010).

Les récepteurs de la famille TGF- β situés à la surface des cellules sont des récepteurs à sérine-thréonine kinase et peuvent être de différents types. Les récepteurs fonctionnels sont de types I et II, alors que les non fonctionnels sont de type III, un protéoglycane transmembranaire, qui a été proposé comme ayant la fonction de régulateur de la présentation du TGF- β aux récepteurs fonctionnels (Massagué, 1992). Chez l'Homme, cinq récepteurs de type II distincts ont été décrits (TGF- β RII, ACVR1IA, ACVR1IB, BMPRII et AMHRII), ainsi que sept récepteurs de type I, appelés aussi « Activin receptor-like kinase » ou ALK 1/2/3/4/5/6/7 (Moustakas & Heldin, 2009).

Les récepteurs de la famille TGF- β vont former un hétéro-tétramère formé classiquement de deux récepteurs de type II avec deux récepteurs de type I. Les récepteurs de type II phosphorylent les récepteurs de type I, qui recrutent à leur tour des protéines SMADs spécifiques en fonction de la nature du récepteur de type I (R-SMAD pour Receptor-regulated SMADs) (Ramachandran et al., 2018; Yigong Shi & Massagué, 2003). Ensuite, la cascade de signalisation TGF- β implique l'activation de protéines SMADs intracellulaires qui déclenchent la transduction du signal. Il existe au total huit SMADs différentes (Huminiacki et al., 2009). Une fois activés, les complexes SMAD migrent vers le noyau où ils ciblent des gènes spécifiques en tant que facteurs de transcription (Salazar, Gamer, & Rosen, 2016).

La nature des récepteurs formant l'hétéro-tétramère est dépendante du ligand. Ces ligands, outre les similitudes de séquence, peuvent être organisés en trois groupes sur la base de l'utilisation préférentielle du récepteur et de l'activité de la signalisation SMAD1/5/8 par rapport à SMAD2/3. Les TGF- β s utilisent les récepteurs TGF- β de type I (ALK5) et de type II (TGFBR2) pour activer la voie SMAD2/3 (Figure 15) (J. He, Xu, Koya, & Kanasaki, 2013; Wrana, 2013). En revanche, les BMPs et les GDF5/6/7 présentent une plus large gamme d'utilisation des récepteurs pour activer la voie SMAD1/5/8 (Figure 15). Comme récepteur de type I, ils peuvent utiliser le récepteur R3 (ALK1), le récepteur à l'activine de type 1 (ALK2), le récepteur au BMP de type 1A (ALK3) et le récepteur au BMP de type 1B (ALK6), avec des récepteurs de type II tels que les récepteurs AMHR2, BMPR2, ACVR2A et ACVR2B (W. Chen & ten Dijke, 2016;

Moustakas & Heldin, 2009). Les activines utilisent ALK4 ($\beta A/\beta A$) et ALK7 ($\beta A/\beta B$ et $\beta B/\beta B$) pour les récepteurs de type I, et ACVR2A et ACVR2B pour les récepteurs de type II (Figure 15) (Moustakas & Heldin, 2009).



Nature Reviews | Endocrinology

Figure 15 : Mécanisme fondamental de la voie canonique de la superfamille de TGF- β . La voie peut être organisée en trois groupes sur la base de l'utilisation préférée du récepteur et de l'activité de signalisation SMAD1/5/8 par rapport à SMAD2/3. Les TGF- β s utilisent les récepteurs TGF- β de type I (ALK5) et de type II (TGFBR2) pour activer la voie SMAD2/3 (bleu). Les BMPs et GDF5/6/7 activent la voie SMAD1/5/8, en utilisant les récepteur R3 (ALK1), le récepteur de l'activine de type 1 (ALK2), le récepteur de BMP de type 1A (ALK3) et le récepteur de BMP de type 1B (ALK6), avec des récepteurs de type II tels que les récepteurs de type II (BMPR2), les récepteurs de l'activine de type 2A (ACVR2A), et ACVR2B (orange). Les activines activent la voie SMAD2/3 via ALK4 ($\beta A/\beta A$) et ALK7 ($\beta A/\beta B$ et $\beta B/\beta B$) pour les récepteurs de type I, et ACVR2A et ACVR2B pour les récepteurs de type II. Les ligands Nodal, GDF8 et GDF11 activent la voie SMAD2/3 via les récepteurs de type I ALK4, ALK5 ou ALK7 et les récepteurs de type II ACVR2A et ACVR2B (orange) (Salazar et al., 2016).

Les ligands Nodal, GDF8 et GDF11 activent la voie SMAD2/3 via les récepteurs de type I ALK4, ALK5 ou ALK7 et les récepteurs de type II ACVR2A et ACVR2B (Moustakas & Heldin, 2009). De plus le récepteur de type I ALK7 est plus spécifiquement dédié à la signalisation du ligand Nodal (Tsuchida et al., 2004). Toutefois, même si ces voies de signalisation sont étudiées et décrites depuis déjà plusieurs années, on y découvre encore de nouveaux mécanismes et acteurs. Dans la transition épithélio-mésenchymateuse, il est démontré par exemple que TGF- β est capable d'activer

SMAD1/5, en plus de SMAD2/3. Dans ce mécanisme, deux récepteurs de type I, ALK5 et ALK2, forment un hétérodimère ALK2/5 entraînant la phosphorylation d'ALK2 par ALK5. Ceci suggère que des formes auto-phosphorylées des récepteurs de type I peuvent exister, stimulant d'autres voies de signalisation via les SMADs (Ramachandran et al., 2018).

Dans le système nerveux, il existe plusieurs membres de la superfamille TGF- β qui contrôlent la prolifération des progéniteurs neuronaux, la survie neuronale, la différenciation et les réponses aux lésions nerveuses (Rydén et al., 1996). Des études montrent que TGF- β 1 est impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules souches neurales et des cellules progénitrices dans le SNC. Son dysfonctionnement est associé à plusieurs pathologies du système nerveux et à son vieillissement (Cohen et al., 2014; Wachs et al., 2006). Cela implique de regarder plus en détail la distribution des récepteurs de cette voie. ALK5 est décrit dans les neurones et interviendrait pour réguler leur développement (Bialas & Stevens, 2013; Y. He et al., 2014). Des études antérieures sur les rongeurs ont démontré que l'exposition neuronale de tels récepteurs était essentielle à la différenciation et à la survie neuronale (Ishihara, Saito, & Abe, 1994; Tomoda et al., 1996; Yi, Barnes, Hand, Polleux, & Ehlers, 2010). L'exposition neuronale du récepteur ALK5 joue également un rôle régulateur des derniers stades de la neurogenèse de l'hippocampe chez l'adulte (Y. He et al., 2014) et protégerait les neurones de la dégénérescence et de la mort cellulaire dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (Brionne, Tesseur, Masliah, & Wyss-Coray, 2003; Tesseur et al., 2017; Tesseur & Wyss-Coray, 2006). Cependant, les mécanismes par lesquels ces neurones peuvent être régulés restent à définir car les ligands de la famille du TGF- β sont multiples au cours du développement du système nerveux mais aussi au cours de son vieillissement et peuvent être de source très diverse. Par exemple, les astrocytes libèrent des membres de la famille TGF- β pour activer dans les neurones ALK5⁺ la production de facteurs du complément, essentiels à la maturation synaptique (Bialas & Stevens, 2013). D'autres données montrent que des membres de la famille TGF- β , GDF11 et GDF8 régulent négativement la prolifération neuronale en reconnaissant les récepteurs de type I ALK4 ou ALK5 (J. Kim et al., 2005; Wu et al., 2003).

En parallèle, des études récentes sur la microglie murine ont montré que des environnements tissulaires distincts peuvent activer une expression élevée d'ARNm *tgfr1* et *tgfr2* codant respectivement pour les récepteurs au TGF- β de type I (ALK5) et de type II (Gosselin et al., 2014). Cette signalisation a également été démontrée comme essentielle au développement, au maintien et à la maturation des populations de la microglie (Attaai et al., 2018; Butovsky et al., 2014; Gosselin et al., 2014; Makwana et al., 2007). D'autres études ont confirmé que la suppression du récepteur au TGF- β de type II déclenche des modifications de la morphologie de la microglie et une expression plus élevée de CD45, qui indique une transformation en un profil apparenté aux macrophages sanguins (Buttgereit et al., 2016). De plus, des données indiquent que l'invalidation postnatale de la signalisation du TGF- β dans la microglie nuit à leur quiescence et compromet leur maintenance et leur survie (Zöller et al., 2018). Ainsi, les récepteurs du TGF- β sont désormais considérés comme une signature spécifique de la microglie résidente par rapport aux macrophages sanguins. Ces données suggèrent que les fonctions de maturation et de maintien de la microglie exercées par le TGF β 1 ont lieu à des stades postnataux très précoces. Ainsi, cette voie de signalisation TGF- β est une voie neuroprotectrice très prometteuse pour l'intégrité du système nerveux, au point que son induction est suggérée comme approche thérapeutique dans le traitement de la maladie de Parkinson (Tesseur et al., 2017).

E. Dialogue médié par des vésicules extracellulaires

Notre intérêt s'est porté sur les mécanismes de communication entre les cellules microgliales et les neurones dépendamment de la voie de signalisation TGF- β . Il faut comprendre que le dialogue entre ces cellules n'est pas seulement dépendant des molécules libres. En effet, si la communication entre les neurones et les cellules microgliales est très importante dans un cerveau sain ou pathologique, cette communication peut également impliquer des vésicules extracellulaires (VEs). Les vésicules extracellulaires sont considérées comme des cargos moléculaires comprenant des protéines, des lipides mais aussi des acides nucléiques (ARNm ou miARN) (Haraszti et al., 2016; Kreimer et al., 2015; Valadi et al., 2007). Le contenu des

vésicules extracellulaires est un moyen de communication entre les cellules et il a un impact sur le métabolisme et le fonctionnement des cellules receveuses.

Les VEs sont constituées de deux sous-types principalement, les exosomes et les microvésicules (Cocucci & Meldolesi, 2015). Les exosomes sont générés à la fin de l'endosome après la maturation des corps multivésiculaires (MVB). La libération exosomale implique plusieurs mécanismes se terminant par la fusion de MVBs avec la membrane plasmique. Les exosomes sont des vésicules dont le diamètre varie entre 30 et 100 nm (Raposo & Stoorvogel, 2013). Les microvésicules sont également décrites sous le terme d'ectosomes, ou de microparticules et résultent du bourgeonnement de la membrane plasmique (Raposo & Stoorvogel, 2013). Les plus petits ectosomes sont d'environ 50 nm, ils sont en moyenne plus grands que les exosomes et peuvent atteindre 1µm de diamètre (Figure 16).

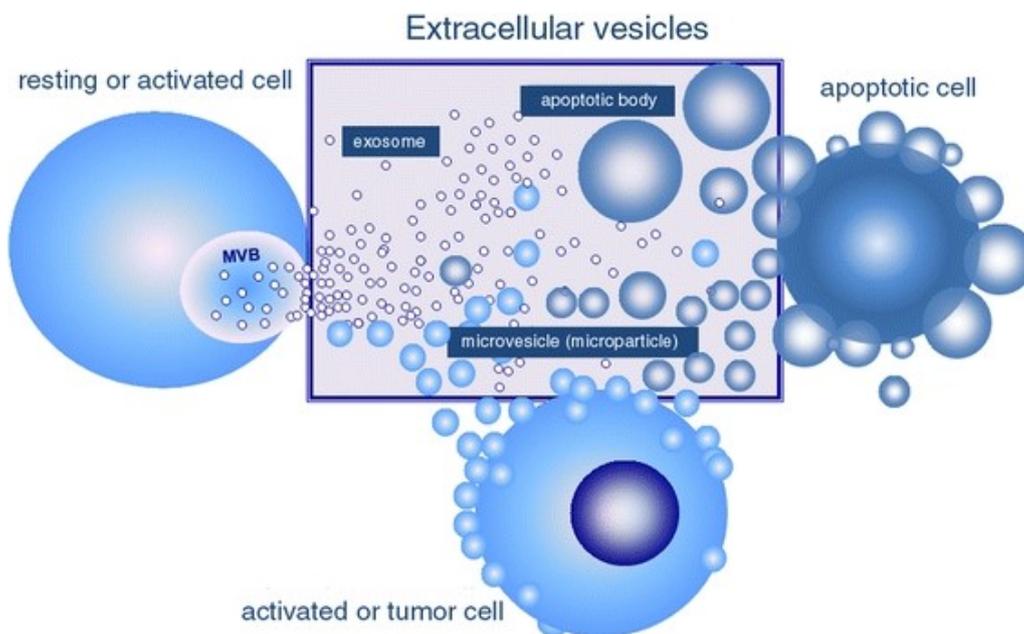


Figure 16: Représentation schématique des vésicules extracellulaires. Les principales populations comprennent : les exosomes qui varie entre 30 et 100 nm ; les microvésicules qui varie entre 50 nm et 1µm de diamètre ; et les corps apoptotiques qui varie entre 1µm et 5µm (György et al., 2011).

Toutefois, le chevauchement des tailles entre ces deux populations principales rend encore aujourd'hui difficile leur distinction (Holme, Brosstad, & Solum, 1993). De plus, les exosomes et les microvésicules partagent un grand nombre de molécules en commun (protéines, lipides et acides nucléiques), qu'il s'agisse de molécules

structurales ou d'actifs biologiques (Lötvall et al., 2014; van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018).

Actuellement, il existe un intérêt croissant pour la compréhension des capacités des VEs à affecter les cellules receveuses en particulier dans les fonctions physiologiques mais aussi pathologiques du SNC (Frühbeis, Fröhlich, & Krämer-Albers, 2012). Elles ont un rôle dans la coordination des fonctions nerveuses en conditions normales et pathologiques (Rajendran et al., 2014; Zappulli, Friis, Fitzpatrick, Maguire, & Breakefield, 2016). De plus, il a été démontré que les VEs ont un rôle important dans la communication neuronale avec les cellules microgliales et qu'elles peuvent être libérées par tous les types cellulaires dans le SNC (Frühbeis et al., 2012). Les cellules nerveuses libèrent différents types de VEs portant plusieurs fonctions connues ou suggérées. Les neurones sécrètent des exosomes qui peuvent influencer la plasticité synaptique (Lachenal et al., 2011). Les microglies modulent la neurotransmission via la sécrétion de microvésicules (Antonucci et al., 2012). Les exosomes dérivés d'astrocytes sont porteurs de neuroprotection et pourraient contribuer à la survie neuronale (Taylor, Robinson, Gifondorwa, Tytell, & Milligan, 2007). De plus, les signaux neuronaux sont capables de déclencher la libération d'exosomes à partir d'oligodendrocytes en augmentant les niveaux de Ca^{2+} intracellulaires (Frühbeis et al., 2012). Lors de l'internalisation par les neurones, ces exosomes pourraient apporter un soutien aux axones. Les microglies absorbent et dégradent les exosomes oligodendrogliaux sans changer leurs propriétés inflammatoires. Dans des conditions pathologiques spécifiques ces exosomes peuvent transférer des antigènes à des cellules microgliales ou à d'autres cellules présentatrices d'antigène et induire des réponses inflammatoires (Figure 17) (Frühbeis et al., 2012).

Il a déjà été démontré que les macrophages infiltrants et les cellules microgliales sont capables de sécréter des VEs contenant des molécules pro-inflammatoires telles que caspase-1, IL-1 β , et IL-18. Mais, il n'est pas encore clairement établi si ces VEs sont à elles seules suffisantes pour induire une neurotoxicité dans le système nerveux (Sankowski et al., 2015). De plus, les VEs libérées par les cellules microgliales activées participent aux processus impliqués dans les maladies neurodégénératives, comme la

maladie d'Alzheimer, en stimulant la formation de peptides amyloïde- β solubles (Joshi et al., 2014).

Les études de ces VEs connaissent un intérêt grandissant car, en plus d'expliquer un nouveau mécanisme physiologique de communication intercellulaire, elles offrent l'opportunité de suivre ces vésicules comme biomarqueurs pathologiques dans les fluides biologiques tels que le sang, l'urine ou encore le liquide céphalo-rachidien.

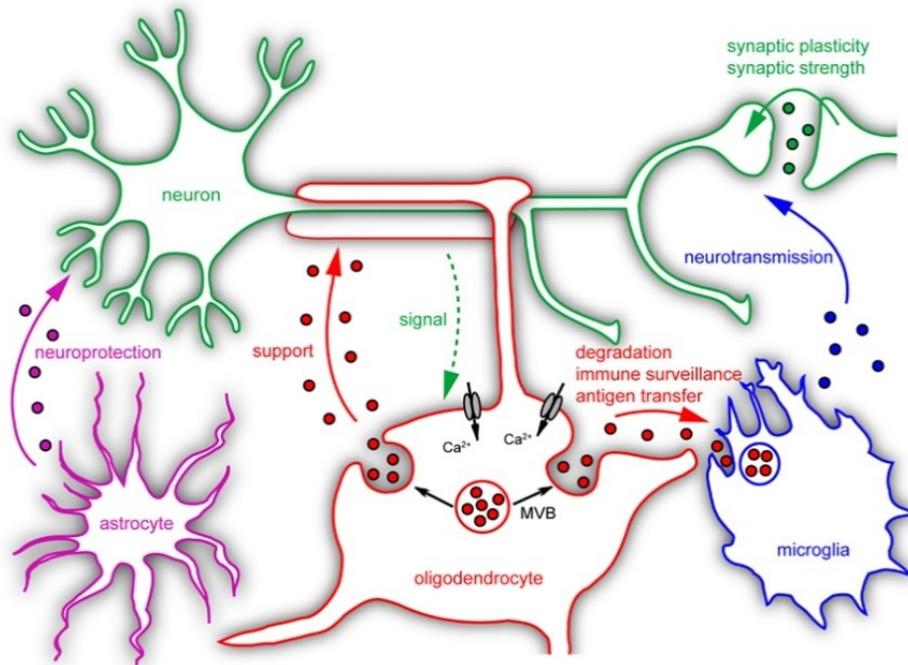


Figure 17: Rôles postulés des microvésicules dans la communication dans le SNC. Les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales sont capables de sécréter des vésicules qui porteront différents rôles. Les signaux de neuronaux déclenchent la libération d'exosome à partir des oligodendrocytes en augmentant les niveaux de Ca^{2+} intracellulaires, cela pourrait apporter un soutien à axones. Dans des conditions pathologiques spécifiques ces exosomes peuvent transférer des antigènes à des cellules microgliales ou à d'autres APC et induire des réponses inflammatoires (Frühbeis et al., 2012).

Les vésicules extracellulaires peuvent en effet refléter le profil fonctionnel des cellules productrices et de ce fait être utilisées pour localiser et/ou évaluer le degré de certaines pathologies (Jan et al., 2017; Osier et al., 2018). De plus, les VEs sont capables d'être transportées au travers des fluides biologiques et d'atteindre d'autres tissus ou organes en traversant certaines barrières physiologiques comme la barrière hématoencéphalique. Cette particularité fait des VEs une nouvelle voie thérapeutique. En effet, les VEs pourraient véhiculer des cocktails thérapeutiques à condition que le transport et l'adressage soient maîtrisés vers les cellules receveuses adaptées (Osier et

al., 2018; Otero-Ortega et al., 2018). Les molécules thérapeutiques peuvent correspondre à des procédés synthétiques, des anticorps, des inhibiteurs ou toutes autres molécules effectrices ou régulatrices, de nature protéique ou nucléique, naturellement présentes dans les VEs. Enfin, des essais cliniques impliquant des VEs modifiées sont déjà en cours de réalisation pour le traitement des accidents vasculaires cérébraux ischémiques aigus.

MATERIELS ET METHODES

1. Matériels biologiques

Tous les protocoles concernant l'utilisation des sangsues ont été réalisés en stricte conformité avec la législation française et le traité européen, et conformément à la déclaration d'Helsinki. Les sangsues adultes *Hirudo medicinalis* ont été obtenues de la société Biopharm (Hendy, Royaume Uni). Les sangsues adultes arrivent toutes au même stade de développement et sont conservées dans des aquariums à température ambiante au laboratoire.

1.1. Dissection du système nerveux central de sangsue

La sangsue est anesthésiée dans de l'éthanol à 10% à 4°C pendant 15 minutes. Ensuite elle est fixée sur un support sur sa face dorsale à l'aide d'épingles, puis la face ventrale subit une incision antéropostérieure à l'aide d'un scalpel. La chaîne nerveuse est prélevée après incision du sinus sanguin ventral et des connectifs latéraux à l'aide de micro-ciseaux. Les chaînes sont disséquées dans une solution de Ringer stérile (NaCl 115 mM, CaCl₂ 1,8 mM, KCl 4 mM, Tris maléate 10 mM, pH 7,4) sous une hotte à flux laminaire.

1.2. Préparation du SNC

Après prélèvement, les SNC sont placés dans 3 bains successifs d'antibiotiques (100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 100 µg/ml de gentamycine) pendant 15 min chacun. Les SNC sont ensuite incubés dans du milieu complet, composé de Leibovitz L-15 (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) complété avec 2 mM de L-glutamine, 100 UI/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 100 µg/ml de gentamycine, 0,6% de glucose, 10 mM d'Hepes et 10% de supplément (SBI System Bioscience, CA Palo Alto, USA), pendant différents temps selon chaque expérience.

Certaines expériences d'hybridation in situ et d'analyses immunohistochimiques sont réalisées à partir de SNC lésés. Dans ces cas précis, la lésion expérimentale est réalisée à l'aide d'une pince fine à partir d'un fragment isolé de 4 ganglions de longueur, en écrasant au milieu des deux connectifs entre le 2ème et le 3ème ganglion. Concernant les expériences d'analyses protéomiques, la chaîne est lésée au milieu des connectifs

entre chaque ganglion sur un fragment de 4 ganglions, faisant par conséquent un total de 3 lésions par fragment.

1.3. Préparation des cultures primaires

Pour la préparation des cultures primaires de microglie ou de neurones, l'ensemble du SNC est placé en boîtes de Pétri de 35 mm contenant 200 µl de milieu complet. Chaque ganglion est soigneusement décapsulé en enlevant la couche de collagène enveloppant la chaîne nerveuse avec des micro-ciseaux. Les cellules nerveuses comprenant les neurones (10-70 µm) et les cellules microgliales (5 µm) sont collectées mécaniquement par grattage doux sur les ganglions et les connectifs. Pour une des analyses protéomiques, les cellules microgliales des ganglions et des connectifs sont collectées dans des boîtes de Pétri séparées, afin d'étudier les deux sous-populations de manières distinctes.

Les cellules microgliales et les neurones sont ensuite séparés en fonction de leur taille par filtration selon différentes porosité de filtres. D'abord, les débris cellulaires sont éliminés au travers d'un filtre PluriStrainer de 100 µm (Dominique Dutscher, Brumath, France). Ensuite, l'éluât cellulaire est à nouveau traité par filtration sur filtre 6 µm pluriStrainer de façon à éluer les cellules microgliales et retenir les neurones dans la partie supérieure du filtre. Les cellules microgliales et neurones enrichis sont centrifugées à 1200 x g pendant 10 min à température ambiante. Ensuite, le culot cellulaire est remis en suspension dans un milieu complet. Ce protocole de séparation des cellules a été mis au point et standardisé au laboratoire. La technique de séparation a également été validée par microscopie optique pour contrôler la bonne séparation des populations cellulaires.

1.4. Milieu conditionné (MC) de sangsue pour les expériences de chimiotactisme

Dix chaînes nerveuses sont disséquées pour collecter les cellules microgliales et les neurones, puis les séparer comme décrit précédemment. Les neurones des 10 chaînes sont mélangés, de même que les cellules microgliales. Chaque population cellulaire

issue des 10 chaînes est incubée en 10 boîtes de Pétri contenant 200 µl de milieu complet pendant 15 minutes (T0). Le milieu est ensuite centrifugé pendant 20 minutes à 1200 x g pour éliminer les cellules microgliales ou les neurones. Le surnageant exempt de cellules est enfin utilisé comme milieu « conditionné » (MC) par les cellules qu'il a incubées. Ce milieu contient en effet leurs produits de sécrétion et sera utilisé dans les expériences de chimiotactisme.

2. Protocoles généraux

2.1. *Extraction d'ARN totaux*

Dix chaînes nerveuses de sangsue sont prélevées et placées dans 1 ml de TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) dans un tube contenant des billes de céramique de 1,4 mm. Puis, elles sont broyées mécaniquement à l'aide d'un homogénéisateur tissulaire Precellys® (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Une fois broyées, les homogénats dans le TRIzol® sont transférés dans de nouveaux tubes stériles de 1,5 ml et reçoivent 200 µl de chloroforme. Après une incubation de 3 minutes, les échantillons sont centrifugés pendant 15 minutes à 12000 x g à 4°C pour ne prélever que la phase aqueuse supérieure, contenant les ARNs, et la transférer dans un nouveau tube. Les ARNs sont précipités par l'ajout de 0,5 ml d'isopropanol. Après une incubation de 10 minutes, les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 12000 x g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot d'ARNs est laissé au fond du tube. Il est lavé par l'ajout de 1 ml d'éthanol 75%. L'échantillon est centrifugé une dernière fois à 7500 x g à 4 °C pour consolider le culot d'ARNs puis le surnageant d'éthanol est éliminé. Le tube est laissé ouvert sous une hotte afin de sécher le culot d'ARNs. Le culot est resuspendu dans 20 µl d'eau stérile (sans RNase).

Les échantillons d'ARN totaux sont dosés à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre Multiskan Sky Microplate (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA). Les extraits d'ARN totaux sont traités à 37 °C pendant 30 minutes avec l'enzyme RQ1-DNase1 (1 µl/µg d'ARN) dans le tampon de réaction RQ1 DNase 10x (Promega, Madison WI, USA) pour éliminer toute contamination par l'ADN génomique. La réaction enzymatique est

stoppée par une incubation de 10 min à 65 °C dans une solution stop (Promega, Madison WI, USA).

2.2. Synthèse des ADN complémentaires

Les ARN totaux extraits des chaînes nerveuses sont rétro-transcrits en ADNc en utilisant le protocole Super Script II (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). L'ADNc est généré à partir de 2 µg d'ARN totaux en présence de 1 µl d'une amorce oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500µg/mL) et 1 µl de dNTPs (10mM), le tout complété par de l'eau stérile pour un volume final de 13 µl. L'échantillon est chauffé à 65°C pendant 5 minutes. Ensuite, 4 µl de tampon Super Script 5X, 1 µl de DTT (0.1 M), 1 µl d'inhibiteur de RNase (40 unités/µl) et 1 µl de l'enzyme SuperScript III (200 unités/µl) sont ajoutés au volume réactionnel. Il est incubé 60 minutes à 50 °C pour la synthèse d'ADNc et 15 minutes à 70°C pour inactiver l'enzyme. Dans les contrôles négatifs, la rétrotranscriptase est remplacée par de l'eau stérile. Les ADNc ont été traités avec 1U de RNaseH (Promega, Madison WI, USA) 20 minutes à 37°C pour éliminer les ARNs et optimiser les réactions d'amplification.

2.3. PCR semi-quantitative (PCR)

Les ADNc sont amplifiés par PCR avec la GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison WI, USA). Un mélange est préparé avec 32,6 µl d'eau stérile, 1 µl d'ADNc, 10 µl de tampon 5X, 1 µl de chaque amorce sens et anti-sens (10 µM) (Tableau 1), 3 µl de MgCl₂ 1.5 mM, 1 µl de dNTP 10 mM et finalement 0.4 µl (1U) de l'enzyme GoTaq. Les différents gènes d'intérêt sont normalisés par rapport à un gène contrôle, dont l'expression n'est pas influencée par les conditions de culture. Ici, nous utilisons l'ARN ribosomal 18S. Les conditions d'amplification sont les suivantes: 3 minutes à 94°C ; 30 cycles de : 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 54°C et 1 minute à 72°C ; et une dernière étape à 72°C pendant 7 minutes. Les produits de PCR sont chargés (15 µL) avec 3 µl de tampon de charge (bleu de bromophénol) sur gel d'agarose 1.5% en TAE, complété en bromure d'éthidium, et sont séparés en TAE 1X pendant 20 minutes à 100V.

2.4. Insertion dans le vecteur PGEM-T easy et Transformation des bactéries JM109

Dans un tube stérile, 8 µL des produits de PCR d'intérêt sont mélangés à 10 µL de tampon de ligase 2X (Tris-HCl 60 mM (pH 7.8), MgCl₂ 20mM, DTT 20mM, ATP 2mM, polyéthylène glycol 10%), 1 µL de vecteur PGEM-T easy (50 ng), 1 µL de T4 DNA ligase (3 unités/µl) et incubés à 4°C pendant 12 heures (Promega, Madison WI, USA). Ensuite, 2 µL de produit de ligation sont ajoutés à 50 µL d'une lignée bactérienne E. coli JM109 (108 cfu/ µL, Promega, Madison WI, USA). La transformation bactérienne est réalisée par choc thermique à 42°C pendant 50 secondes suivie d'une incubation sur la glace pendant 2 minutes. Puis, 950 µL de SOC (2g Bacto-tryptone, 0.5g Bacto-yeast extract, 1 mL NaCl 1M, 0,25 mL KCl 1M, 1 mL Mg²⁺ 2M, 1 mL glucose 2M) sont ajoutés au mélange et incubés pendant 90 minutes à 37°C sous agitation. L'échantillon est étalé dans une boîte de Pétri en présence d'ampicilline 100 µg/µL, d'IPTG et de X-Gal et incubé 12h à 37°C. Les colonies blanches sont sélectionnées pour être remises en culture dans un milieu liquide LB/ampicilline 100 µg/µL.

2.5. Extraction plasmidique

Avant de réaliser l'extraction plasmidique à partir des bactéries JM109 pour pouvoir séquencer le produit de PCR qui a été inséré à l'intérieur du plasmide, il est nécessaire de confirmer la présence du fragment d'intérêt. Pour cela, une PCR est effectuée à partir de 1µL de culture en utilisant le protocole décrit ci-dessus et en utilisant les amorces spécifiques. Ensuite, les cultures bactériennes en milieu liquide sont centrifugées à 6000 x g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot bactérien est repris avec 250 µL de tampon A1 (Plasmid DNA purification, Macherey-Nagel, Duren, Allemagne). Afin de lyser les bactéries, 250 µL de tampon A2 préalablement chauffé à 30-40°C est ajouté. L'arrêt de la lyse s'effectue par ajout de 300 µL de tampon A3. L'échantillon est centrifugé 10 minutes à 11000 x g, puis le surnageant est chargé sur colonne NucleoSpin, centrifugée 1 minute à 11000 x g. Cette étape est répétée jusqu'à avoir chargé tout le surnageant. La colonne doit ensuite être lavée avec 500 µL de tampon AW préchauffé à 50°C et centrifugé pendant 1 minute à 11000 x g. Un deuxième lavage

est réalisé avec 600 µL de tampon A4 et centrifugé pendant 1 minute à 11000 x g. Afin de sécher la colonne, 2 centrifugations de 2 minutes sont réalisées à 11000 x g pour éliminer les restes d'éthanol puis 50 µL d'eau sont ajoutés. L'échantillon est centrifugé 2 minutes à 11000 x g. Les plasmides sont quantifiés au spectrophotomètre à 260 nm.

2.6. Extraction de protéines totales

Les extraits protéiques à partir du SNC entier, des cellules microgliales ou des neurones sont réalisés à partir de 10 chaînes nerveuses incubées 24 heures après leur lésion. L'extraction est réalisée dans un tampon RIPA (NaCl 150 mM, Tris 50 mM, EGTA 5 mM, EDTA 2 mM, NaF 100 mM, pyrophosphate de sodium 10 mM, Nonidet P-40 1%, PMSF 1 mM, inhibiteurs de protéase 1X). Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation (1200 x g pendant 20 min à T° amb.). Les surnageants sont prélevés pour établir la concentration de protéines par la méthode de Bradford (BioRad, Hercules CA, USA).

3. Exploitation de banques de données

Dans le consortium *Hirudinea Genomics* formé autour de plusieurs laboratoires travaillant sur la sangsue médicinale, nous avons contribué à créer un premier jeu de données issu du génome de *Hirudo medicinalis* tel que décrit précédemment (Hsu et al., 2017). Les séquences ont été assemblées à partir de courtes séquences combinées à l'aide des algorithmes Velvet et PHRAP/CONSED (Gordon & Green, 2013; Zerbino, 2010) puis analysées par GlimmerHMM pour obtenir une première base de données d'ARNm prédite (Majoros, Pertea, & Salzberg, 2004). Les molécules d'intérêts que nous souhaitons étudier chez notre modèle sont ensuite recherchées dans les banques d'ARNm prédites de sangsue par un programme local BLAST dans le logiciel BioEdit (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990). Les séquences candidates, représentant des ARNm partiels ou entiers, sont enfin soumises aux bases de données Swiss-Prot en utilisant BLAST afin de préciser les degrés d'homologie avec les autres organismes puis font l'objet d'une vérification des séquences par amplification par PCR à partir d'extraits d'ARN totaux issus de la sangsue.

4. Caractérisation moléculaire par SMARTer® RACE 5'/3'

En utilisant la recherche par BLAST local, comme décrit précédemment dans l'exploitation des banques de données, des ARNm putatifs ont été identifiés comme homologues du récepteur de type I au TGF- β humain et du TGF- β 1 humain. Ensuite, à partir de séquences d'ARNm partielles putatives, on a des amorces spécifiques sont dessinées pour obtenir les séquences naturelles et complètes par RACE-PCR.

4.1. SMARTer® RACE 5'/3'

Les ARN totaux sont extraits de 10 chaînes nerveuses avec du TRIzol® (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, États-Unis) comme décrit plus haut. Les ARN totaux extraits sont là encore traités avec RQ1-DNase1 (Promega, Madison WI, USA) pour empêcher toute contamination par l'ADN génomique, comme décrit précédemment. Pour cette expérience, 2 μ g d'ARN totaux sont utilisés.

4.2. Préparation d'ADNc pour la RACE 3' et 5'

Le kit SMARTer® RACE 5' / 3' (Takara, Kusatsu, Japon) pour la préparation d'ADNc. Pour commencer, 2 μ g d'ARN et 1 μ l de 5'-CDS Primer A sont ajoutés à de l'eau stérile dans un volume final de 10 μ l (5'-RACE-Ready cDNA). Pour générer la banque 3'-RACE-Ready cDNA, 2 μ g d'ARN et 1 μ l de 3'-CDS Primer A sont également ajoutés à de l'eau stérile dans un volume final de 10 μ l. Ces deux banques sont construites dans deux réactions distinctes. Ensuite, les tubes sont incubés à 72 °C pendant 3 minutes pour linéariser les ARNs, puis refroidis. Dans le tube de la synthèse de 5'-RACE cDNA uniquement, 1 μ l de SMARTer II A Oligonucléotide est ajouté. Auparavant, le tampon pour la synthèse d'ADNc dans les deux banques est préparé (4 μ l de tampon 5X, 0,5 μ l de DTT 100 mM, 1 μ l de dNTPs 20 mM). Un Master Mix (volume réactionnel commun) est préparé pour les deux réactions 5'- et 3'-RACE-Ready cDNA (5,5 μ l du tampon, 0,5 μ l d'inhibiteur de RNase (40 U/ μ l), 2 μ l de SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U)). Les 8 μ l totaux de Master Mix sont ajoutés à l'ARN linéarisé dans chaque réaction (3'-RACE cDNA et 5'-RACE cDNA). Les échantillons sont incubés pendant 90 minutes à

42°C, puis pendant 10 minutes à 70 °C. Enfin, les deux banques 3'-RACE cDNA et 5'-RACE cDNA sont diluées avec 90 µl de tampon Tricine-EDTA et stockées à -20°C.

4.3. *Nested PCR*

Les réactions d'amplification d'ARN d'intérêt nécessitent de réaliser une « Nested PCR » respectant les instructions de Takara dans le kit SMARTer® RACE 5'/3' (Takara, Kusatsu, Japon). L'utilisation d'amorces spécifiques (ci-après) dessinées dans les extrémités des ARN putatifs identifiés dans nos banques serviront à l'amplification :

Récepteur de type I au TGF-β (*tgfbr1*)

Fw1: 5'-AATAATCTTCGTCCTCTTCTTCT-3'

Fw2: 5'-TGGTGCCAGCATAGAAAGGTCC-3' (plus interne à Fw1)

Rv1: 5'-CACTGCCCACTCTGTTGTTG-3'

Rv2: 5'-CGACTTTATCTGACTCTGAGTCA-3' (plus interne à Rv1)

TGF-β1 (*tgfb*):

Fw1: 5'-GTGGTTCTCGGACTCTCAAACGC-3'

Fw2: 5'-CGGCATCAGAATGCCCAACCTG-3' (plus interne à Fw1)

Rv1: 5'-TCGCCCCGTACACGATCTTCATCC-3'

Rv2: 5'-GGCACAGCACATGCCTTTGTATTT-3' (plus interne à Rv1)

Un premier tour de PCR utilise 2,5 µl de banque d'ADNc SMARTer comme matrice en présence de 5 µl d'amorce universelle 10X (UPM) et 1 µl d'amorce spécifique (précisée ci-dessus) auxquels sont ajoutés 41,5 µl de tampon réactionnel (15,5 µl d'eau, 25 µl de tampon SeqAmp 2X et 1 µl de SeqAmp DNA Polymerase). Pour l'amplification de l'extrémité 5' de chaque ADNc d'intérêt, la banque SMARTer utilisée est la 5'-RACE cDNA et l'amorce spécifique est l'amorce Rv1. Pour l'amplification de l'extrémité 3' de chaque ADNc d'intérêt, la banque SMARTer utilisée est la 3'-RACE cDNA et l'amorce spécifique est l'amorce Fw1. Dans les deux cas, l'amorce universelle UPM reconnaît les adaptateurs de la banque placés aux extrémités. Un second tour d'amplification utilise comme matrice 2,5 µl du produit de la 1^{ère} PCR, 5 µl d'amorce universelle 10X (UPM) et 1 µl d'amorce spécifique (cette fois-ci Fw2 ou Rv2 selon que l'on amplifie à partir des banques 3'-RACE cDNA ou 5'-RACE cDNA respectivement) auxquels sont ajoutés 41,5 µl du tampon réactionnel utilisé précédemment. Les cycles de réactions ont été réalisés comme suit: 94°C pendant 1 minute, puis 40 cycles de 30 secondes à 94°C, 30

secondes à 56°C et 2 minutes à 72°C. Les produits de la Nested PCR sont ensuite insérés dans le vecteur pGEM T-easy (Promega, Madison WI, USA) et clonés dans des cellules JM109 comme décrit précédemment. Les produits sont finalement séquencés en utilisant le kit de polymérisation BigDye Terminator v3.0 avant la détection sur l'analyseur génétique (Applied Biosystems, Foster City CA, USA). L'assemblage des séquences des extrémités 5' et 3' a permis de caractériser les ARNm complets de *tgfbr1* et de *tgfb* codant respectivement pour le récepteur ALK4/5 (numéro d'accès GenBank MH346327) et la molécule nGDF (numéro d'accès GenBank MH346328).

5. Analyse de l'expression génique

Les neurones et les cellules microgliales ont été recueillis, comme décrit précédemment, à partir de 10 chaînes nerveuses pour chaque condition expérimentale et incubés dans un milieu complet à différents temps selon l'expérience réalisée. Les ARN totaux sont extraits, quantifiés et purifiés, comme décrit précédemment. La synthèse d'ADNc a été générée à partir de 2 µg d'ARN totaux, comme décrit précédemment.

5.1. Q-PCR

Les PCR quantitatives en temps réel (qPCR) sont réalisées avec le SYBR Platinum qPCR SuperMix (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) en combinant 2 µl de matrice d'ADNc, 1 µl de d'amorce (10 µM) sens (Fw), 1 µl d'amorce antisens (Rv) et 25 µl de tampon platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG dans un volume final de 50 µL. Les amorces spécifiques conçues pour l'analyse qPCR, sont les suivantes :

ngdf :

Fw: 5'-TGCTTGTGGTTCTCGGACTC-3'

Rv: 5'-TTTCGCTCTGATCTGCTGCA-3'

hmc1q :

Fw: 5'-GTCTCGGGAGTGCAAGGAAT-3'

Rv: 5'-TGTATTGTTCCCGACTCGCC-3'

hmil16 :

Fw: 5'-ACACAACCACGGTGAAGTTG-3'

Rv: 5'-TGACACCTCCTTTCCATTCA -3'

hmemapii :

Fw: 5'-AGAAGCAAGCCAATCAACCT -3'

Rv: 5'-TGCTCGACGTACAAGGAGTC-3'

18s :

Fw: 5'-GGAGGAGCGCGTTTATTAAG-3'

Rv: 5'-GGGCACACACTTGAAACATC-3'

Les réactions de qPCR sont réalisées sur le système CFX 96 Real-Time System (BioRad, Hercules CA, USA) avec les conditions suivantes: 2 min à 50°C (1 cycle), 2 min à 95°C (1 cycle), 30 s à 95°C, 30 s à 58°C et 30 s à 60°C (39 cycles) suivis d'une courbe de fusion finale pour contrôler la spécificité amplifiée.

Le niveau d'expression du gène *ngdf* est comparé entre les neurones 15 minutes (T0) et les neurones cultivés 24 heures après la lésion (T24 h). Le niveau d'expression du gène *hmc1q* est d'abord comparé entre les neurones naïfs et les neurones stimulés avec le TGF- β humain recombinant (20 ng/ml, Sigma-Aldrich, Saint Louis MO, USA), en tant que ligand d'ALK5. Dans un deuxième temps, le gène *hmc1q* est comparé entre les neurones non stimulés et les neurones issus de la co-culture avec les cellules microgliales, précédemment séparés grâce à une membrane Transwell® de porosité 0,4 μ m (Corning, Corning NY, États-Unis). La co-culture est réalisée avec ou sans SB431542 (20 μ M, R & D Systems, Minneapolis MN, États-Unis), un inhibiteur spécifique d'ALK5 et ALK4 (Inman et al., 2002).

Toutes les expériences ont été effectuées sur des échantillons en triplicat. L'analyse de l'expression génique relative de *hmc1q* et de *ngdf* est calculée en utilisant la méthode 2- $\Delta\Delta$ Ct (Livak & Schmittgen, 2001). Les analyses statistiques sont effectuées par T-test apparié en utilisant le logiciel GraphPad Prism 6.0. Les différences statistiques sont considérées comme significatives si la valeur de p est inférieure à 0,05.

6. Hybridation in situ par fluorescence (FISH)

6.1. Préparation des ribosondes

Des ribosondes anti-sens et sens spécifiques utilisant des UTP marqués avec la digoxigénine ont été générées. La ribosonde d'*alk4/5* a été générée à partir de la séquence 688-1356 nucléotides (Genbank MH346327) (taille de 668nt) avec les amorces spécifiques (5'-AAGTGTGGAGGGGTGTATGG-3' et 5'-CTCTTCGTGCGTTGGATCAG-3') et celle de *ngdf* à partir de la séquence 156-592 nucléotides (Genbank MH346328) (taille de 436nt) avec les amorces spécifiques (5'-CATCATCTTCACCGCCACCT-3' et 5'-GTTGGGATCGCTGAGTTTGC-3').

6.1.1. Purification

Les produits de PCR sont purifiés grâce au Kit QIAquick PCR purification (Qiagen, Hilden, Allemagne). Cinq volumes d'amplicon (35 µl) avec tampon PI sont placés sur une colonne et centrifugés 1 minute à 17900 x g. Ensuite, 750 µl de tampon PE sont ajoutés et centrifugés 1 minute à 17900 x g. Puis, l'échantillon est centrifugé à vide pendant 1 minute à 17900 x g pour éliminer les résidus d'éthanol. L'élution est réalisée avec 30 µL d'eau en centrifugeant 1 minute à 17900 x g.

6.1.2. Ligation et transformation des bactéries

Après purification par le Kit QIAquick PCR purification, le produit est inséré dans le vecteur pGEM-T easy (Promega, Madison WI, USA) pour ensuite réaliser une transformation de bactéries JM109, comme précédemment décrit. Une fois les bactéries sélectionnées, elles sont mises en culture liquide pour l'extraction plasmidique ultérieure. Tous ces protocoles ont été décrits précédemment.

6.1.3. Linéarisation.

Pour chaque séquence nucléotidique, la linéarisation de l'ADN plasmidique est réalisée avec les enzymes de restriction (Roche, Bâle, Suisse) Apa I (40 unités/µL) ou Sac I (10 u/µL) à 30°C et 37°C respectivement pendant 2h en bain marie en présence des réactifs fournis dans le kit (BSA, tampon 10X, Roche, Bâle, Suisse). La précipitation des

sondes est effectuée 2h à -80°C (25 µl d'acétate de sodium 0.3 M et 300 µl EtOH 100%). Après centrifugation (14000 x g, 30 minutes, 4°C), le culot est rincé à l'éthanol 70% et séché à l'air libre sous hotte avant d'être repris dans 20 µL d'eau stérile. Les plasmides linéarisés sont dosés au spectrophotomètre à 260 nm puis vérifiés sur gel d'agarose 1%.

6.1.4. Transcription *in vitro*.

La production des sondes sens et anti-sens a été réalisée *in vitro* en utilisant la RNA polymérase SP6 (20u/µL, Roche, Bâle, Suisse) pour le plasmide digéré avec Apa I et la RNA polymérase T7 (20u/µL, Roche, Bâle, Suisse) pour le plasmide digéré avec Sac I. Dans les 2 cas, la transcription a été effectuée en présence de dNTP 10mM, d'UTP marqué à la biotine et des réactifs fournis par le kit Roche[®] (tampon 10X, RNAsin 40 unités/µL). Après 3h à 37°C, la réaction est stoppée par ajout d'EDTA 0.33M (pH 8) au milieu réactionnel. La précipitation des sondes s'effectue pendant 1h à -80°C (ARNt, LiCl 7.5 M, éthanol 100%). Après centrifugation (13000 x g, 30 min, 4°C), le culot est rincé avec l'éthanol 70% et séché à l'air libre sous hotte avant d'être repris dans de l'eau stérile. La séquence d'ARN d'intérêt a été obtenue par transcription *in vitro* en utilisant le kit de marquage d'ARN-DIG selon les instructions du fabricant (Roche, Bâle, Suisse).

6.2. Protocole d'hybridation *in situ* dans le SNC de sangsue

Les chaînes nerveuses de sangsues sont incubées pendant 24 heures post-lésion et fixées pendant une heure à 4°C dans du paraformaldéhyde 4%. Puis, le protocole d'hybridation est réalisé comme indiqué ci-dessous (Dykes, Freeman, Bacon, & Davies, 2004) avec des modifications que l'on décrira par la suite.

Les chaînes nerveuse fixées sont lavées 4 fois pendant 5 minutes avec une solution de PBT (PBS 0,1M/Tween 20 0,1%) et sont ensuite perméabilisées pendant 10 minutes par digestion avec la Protéinase K (10 pg/ml) (Sigma-Aldrich, Saint Louis MO, USA). Ensuite, les chaînes sont lavées deux fois 5 minutes dans du PBT, puis fixées à nouveau pendant 25 minutes dans du paraformaldéhyde 4% à température ambiante et lavées quatre fois pendant 5 minutes dans du PBT. Les fragments de chaînes nerveuses sont

ensuite incubés pendant 10 minutes dans un mélange PBT/Hybe(-) (50:50) (formamide 50% (v/v), SSC 5X, Tween 20 0,1% (h/v) pH 6,5) puis pendant 3 heures dans le tampon Hybe(-) à 42 °C.

L'hybridation a été effectuée pendant la nuit à 42°C avec des ribosondes dans Hybe(+) (formamide 50% (v/v), SSC 5X, Tween 20 0,1% (h/v), 500 µg/ml d'ARNt, 50 µg/ml d'héparine et eau). Après hybridation, les chaînes nerveuses sont lavées au travers des bains suivants à 42°C: deux fois pendant 5 minutes et trois fois pendant 20 minutes dans Hybe(-), puis à température ambiante 10 minutes dans un mélange PBT/Hybe(-) (50:50) et quatre fois pendant 5 minutes dans du PBS/Glycine 0,2 M.

Les chaînes nerveuses sont ensuite incubées avec le tampon de blocage 1/5 dans du PBT (Roche, Bâle, Suisse) pendant 30 minutes puis incubées avec un anticorps anti-DIG dilué au 1/700^{ème} (abcam64509, Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) pendant 2 heures à température ambiante. Après 4 lavages de 10 minutes dans du PBT suivi d'une incubation pendant 30 minutes dans un tampon bloquant dans le PBT, les échantillons sont incubés avec l'anticorps secondaire conjugué à Alexa Fluor 488 (1:1500, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dans un tampon de blocage (Roche, Bâle, Suisse) et rincé avec du PBT. Les noyaux cellulaires sont colorés par un intercalant fluorescent de l'ADN Hoechst 33342 (1:10000, Invitrogen, Carlsbad CA, USA) pendant 20 minutes. Les fragments de chaînes nerveuses sont ensuite montés sous lamelle pour être observés au microscope à fluorescence (Agilent, Santa Clara CA, USA).

Les observations des lames sont réalisées avec un microscope confocal Zeiss LSM700 relié à un Zeiss Axiovert 200 M avec un objectif d'immersion d'huile à ouverture numérique EC Plan-Neofluar 40x / 1,30 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Allemagne). Le traitement des images est effectué à l'aide du logiciel Zen. Les mêmes paramètres sont appliqués sur l'ensemble des images ainsi que sur les contrôles.

7. Etude du recrutement des cellules microgliales de sangsue

7.1. Tests de chimiotactisme

Des tests de chimiotactisme *in-vitro* sont effectués en utilisant le test double P décrit par Köhidai, avec des modifications mineures (Köhidai, 1995). Des boîtes de Pétri de 35 millimètres de diamètre sont remplies avec 4 ml de gélose 1% et une solution de gélatine 0,5%. Après séchage, deux puits de 6 mm de diamètre sont réalisés, chacun des puits présente un canal individuel parallèle. Un puits est rempli avec 100 µl de cellules microgliales purifiées (voir ci-dessus) et le second avec un facteur chimiotactique ou des contrôles négatifs. Un canal est ensuite créé perpendiculairement aux canaux qui sont reliés aux deux puits en utilisant une lamelle en verre. Une heure plus tard, les cellules du puits contenant le chimioattractant sont récoltées. Le nombre de cellules en migration est compté sur un hémocytomètre (cinq numérations différentes) sous microscope Axioskop (Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Les expériences sont effectuées en triplicat. Les résultats sont exprimés en pourcentage moyen de cellules ayant migré, en tenant compte de la quantité initiale qui est égale à 100% ± SD. Les comparaisons entre les moyennes ont été effectuées à l'aide d'un test Anova unidirectionnel utilisant le logiciel GraphPad Prism 6.0. Les différences statistiques sont considérées comme significatives si $p < 0,05$.

Les expériences de chimiotactismes sont réalisées avec différentes concentrations (0 ; 0,5 ; 1 ; 5 et 10 ng/ml) de la forme recombinante de TGF-β humain (H8541, Sigma-Aldrich, Saint Louis MO, USA).

En outre, des expériences sont réalisées avec du milieu conditionné contenant les sécrétomes de cellules microgliales ou de neurones distinctement. Les deux sont collectés après 15 minutes d'incubation des cellules en cultures primaires, comme expliqué précédemment dans la préparation des milieux conditionnés. Les milieux conditionnés sont utilisés comme facteurs chimioattractants.

De plus, des expériences avec du milieu conditionné de neurones ont été réalisées en présence, dans le puits des cellules, d'un anticorps neutralisant anti-ALK5 humain polyclonal fait chez le lapin (1:100, ab135310, Abcam Cambridge, Royaume-Uni) pour

inhiber le récepteur. Les cellules microgliales ont été pré-incubées pendant 1 heure à température ambiante avec l'anticorps avant la réalisation du test. Dans chaque expérience, des contrôles négatifs ont été réalisés avec du milieu L-15 complet seul comme chimioattractant.

7.2. Tests de recrutement de cellules microgliales ex vivo

L'expérience est réalisée dans les connectifs de sangsues lésées (comme décrit ci-dessus) à différents temps post-lésion (T6h, T16h et T24h) perfusés avec un anticorps polyclonal anti-ALK5 humain fait chez le lapin (1:50, ab133510, Abcam, Cambridge, Royaume Uni) ou avec un contrôle IgG issu de lapin témoin (1:50, SC2027, Santa Cruz CA, USA) à la même dilution. Un volume de 8µL d'anticorps est injecté l'intérieur du connectif entre le 2ème et le 3ème ganglion dans un fragment de chaîne composée de 4 ganglions. Les connectifs entre les ganglions 2 et 3 sont écrasés immédiatement après l'injection avec des pinces fines. L'expérience est réalisée à partir de tissus maintenus en culture pendant les différents temps post-lésion. Les tissus sont ensuite fixés T6h, T16h ou T24h après la lésion dans le paraformaldéhyde 4%, pH 7,4 pendant 1 heure. Le recrutement des cellules microgliales est suivi en utilisant un marqueur fluorescent nucléaire Hoechst 33342 (1:10000, Invitrogen, Carlsbad CA, USA) pendant 20 minutes à 4°C. Le mouvement des cellules microgliales en réponse à ces différentes injections est ensuite observé avec un microscope confocal Zeiss LSM700 relié à un Zeiss Axiovert 200 M avec un objectif d'immersion d'huile à ouverture numérique EC Plan-Neofluar 40x / 1,30 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Allemagne).

8. Immunohistochimie

Dans ces expériences, différents anticorps polyclonaux ont été utilisés : l'anticorps polyclonal de lapin anti-TGF-β1 humain (1:100, ab92486, Abcam, Cambridge, UK), l'anticorps polyclonal de lapin anti-ALK5 humain (1:250, ab125310, Abcam, Cambridge, UK), l'anticorps polyclonal de lapin anti-SMAD2 humain (1:250, 12570-1-AP, proteintech, Manchester, UK), l'anticorps polyclonal de chèvre anti-ACVR2B humain (1:250, PA5-47005, ThermoFisher, MA, USA), et l'anticorps polyclonal de souris anti-Alix humain (1:500, ab88743, Abcam, Cambridge, UK).

Les anticorps ont été utilisés pour réaliser des immunofluorescences dans des chaînes nerveuses lésées incubées dans du milieu L-15 complet pendant différents temps selon l'expérience: 15 minutes (T0), 6 heures (T6h) ou 24 heures (T24h) post-lésion, comme décrit dans chaque expérience.

L'expérience utilisant l'anti-TGF- β 1 humain a été réalisée avec ou sans ligature. Cette ligature est réalisée avec un fil de nylon entre les connectifs et les ganglions, à la sortie des ganglions, afin d'isoler la région ganglionnaire de la lésion faite dans les connectifs.

Les expériences utilisant l'anticorps polyclonal anti-C1qBP humain fait chez le lapin (1:500, HPA026483, Sigma-Aldrich, Saint Louis MO, USA) ont été réalisées sur des chaînes nerveuses lésées, puis laissées 24 h dans du milieu L-15 complet en présence de SB431542 (20 μ M, R&D Systems, Minneapolis MN, USA) qui est un inhibiteur spécifique d'ALK4/5, ou en présence de son véhicule (DMSO, 100 mM). L'injection de l'inhibiteur a été réalisée dans des ganglions décapsulés adjacents des connectifs lésés afin d'atteindre le site de la lésion à l'intérieur même des tissus. Pour les injections, les pipettes patch ont été extraites d'un capillaire en verre borosilicaté (diamètre extérieur 1,5 mm, Clark GC 150 F-10) en utilisant un extracteur horizontal à micropipettes à deux étages (modèle P-97, 3 à 5 M Ω , Sutter Instrument, Novato, CA, USA).

Après les différents temps d'incubation, les chaînes nerveuses sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% à température ambiante pendant 1 h. Après fixation, les tissus sont lavés 3 fois dans du PBS, perméabilisés par une incubation 24 h à 4°C dans une solution de perméabilisation (Triton X100 1% dans du PBS) et pré-incubés dans un tampon bloquant (Triton X100 1%, NDS 3% et ovalbumine 1% dans du PBS/glycine 0,1 M), pour bloquer la coloration de fond non spécifique, pendant 8 h à 4°C. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire approprié dilué dans un tampon de blocage. Après 3 lavages avec du PBS, les échantillons sont incubés 1 h à 37°C avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin fait chez la chèvre et conjugué à l'Alexa Fluor 488 (1:2000, Invitrogen, Carlsbad CA, USA) dans un tampon de blocage. Les échantillons sont ensuite rincés avec du PBS et les noyaux cellulaires sont colorés avec un marqueur fluorescent nucléaire Hoechst 33342 (1:10000, Invitrogen, Carlsbad CA, USA) pendant 20 min à 4°C. Finalement, les chaînes

nerveuses sont montées sur lame avec un support de montage fluorescent Dako (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Des échantillons sans addition d'anticorps primaire ont été utilisés comme contrôle négatif. L'observation des lames est réalisée avec un microscope confocal Zeiss LSM700 relié à un Zeiss Axiovert 200 M avec un objectif d'immersion à l'huile à ouverture numérique EC Plan-Neofluar 40x / 1,30 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Allemagne). Les caractéristiques d'acquisitions de l'image sont les mêmes tout au long des expériences pour assurer la comparaison des résultats. Le traitement des images a été effectué à l'aide du logiciel Zen et appliqué sur l'ensemble des images ainsi que sur les contrôles.

9. Western-Blot

Les extraits protéiques issus du SNC entier, des cellules microgliales ou des neurones sont réalisés à partir de 5 chaînes nerveuses pour les SNC et 10 chaînes nerveuses pour les cellules. Après un temps d'incubation de 24 h après lésion, les échantillons sont lysés avec un tampon RIPA. Les surnageants sont recueillis et les concentrations de protéines mesurées en utilisant la méthode de Bradford (BioRad, Hercules CA, USA), comme décrit précédemment.

9.1. L'électrophorèse-SDS PAGE

Pour chaque condition expérimentale, une séparation SDS-PAGE est réalisée avec un gel de polyacrylamide à 4 et 12%. Le gel de polyacrylamide est composé d'un gel de séparation à 12% (Tris/HCl 1,5 M, pH 8,8, Acrylamide/Bis Acrylamide 40% 29:1, SDS 10%, APS 10%, TEMED) et d'un gel de concentration à 4% (Tris/HCl 0,5 M, pH 6,8, Acrylamide/Bis Acrylamide 40% 29:1, SDS 10%, APS 10%, TEMED).

L'extrait protéique (30 µg) est homogénéisé (v/v) dans du tampon Laemmli 2X (Tris/HCl 0,9 M, Glycérol 50%, SDS 10%, β-mercaptoéthanol 5 mM, Bleu de Bromophénol 0,01 %). Les échantillons sont chargés sur le gel, en même temps que le marqueur de poids moléculaire qui nous permet d'estimer la taille des protéines (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA). La migration des protéines est effectuée dans un tampon TGS pH

8,5 (Tris 25 mM, glycine 192 mM et SDS 0,1%) et réalisée en deux phases (20 minutes à 70 V et 50 minutes à 200 V).

9.2. Transfert sur membrane

Une fois la migration terminée, un transfert des protéines sur membranes de nitrocellulose Amersham™ Hybond™-ECL (GE Healthcare, Little Chalfont, Royaume-Uni) est réalisé en milieu semi-sec avec un tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM et méthanol 20%) sur un appareil de Transfert semi-sec à 23 V pendant 30 minutes (BioRad, Hercules, CA, USA).

9.3. ImmunoBlot

Après transfert, la membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante dans du tampon de blocage (Tween 20 0,05% p/v, lait en poudre 5% p/v dans du PBS 0,1 M, pH 7,4). Ensuite la membrane est incubée pendant une nuit à 4°C dans l'anticorps polyclonal primaire anti-TGF- β humain de lapin (1:200, Abcam, Cambridge, Royaume Uni) dans du tampon de blocage. Puis, trois rinçages sont effectués avec du PBS-Tween 20 0,05% pendant 15 minutes. La membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante dans le tampon de blocage avec un anticorps polyclonal secondaire anti-IgG de lapin fait chez la chèvre (1:20 000) et conjugué de manière covalente à l'enzyme HorseRadish Peroxydase (HRP). Finalement, après 3 lavages de 15 minutes en PBS-Tween 0,1%, l'activité enzymatique de la HRP est révélée par chimioluminescence en utilisant le Kit ECL Supersignal West Pico Chemoluminescent (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) puis observée en ImageQuant™ LAS 4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japon).

10. Etudes protéomiques

10.1. Banque de données protéomiques

En ce qui concerne les analyses protéomiques, comme il n'existe pas de banque de données protéomiques chez la sangsue, une base de données est créée à partir de la banque d'ARNs prédits. La traduction *in silico* de ces données permet l'obtention de

« protéines prédites » servant ensuite de banque référence. L'analyse des données brutes est également effectuée sur la base de données Swissprot (Boutet et al., 2016) à l'aide du logiciel d'alignement BLAST (Altschul et al., 1990). Toute annotation faite sur des séquences de mammifères fait l'objet d'une vérification manuelle pour contrôler la pertinence de l'alignement. Les séquences avec une e-value $\leq 0,1$ sont prises en compte. Python Script est utilisé l'analyse des résultats. Pour chaque séquence, seul le meilleur résultat après la comparaison des séquences est conservé pour annoter chaque protéine. Puis, l'outil API Rest Uniprot permet de définir des orthologues humains pour toutes les séquences annotées. Cette procédure simplifie les analyses protéomiques, grâce à l'annotation d'orthologues réalisée directement à partir des molécules humaines.

10.2. Préparation des échantillons

10.2.1. Etude protéomique à la lésion

Une analyse protéomique à grande échelle est développée sur des connectifs lésés dans les chaînes nerveuses de sangsue. Cette étude protéomique à haute résolution spatiale est réalisée sur culture organotypique de fragments isolés de la chaîne nerveuse en respectant l'intégrité de plusieurs ganglions reliés par des tissus conjonctifs. Des expériences de micro-extraction de protéines sont réalisées à l'aide de la plateforme TriVersa Nanomate (Advion BioSciences, Ithaca NY, USA) avec la fonction d'analyse de surface par extraction liquide, LESA (KESESZ et Van Berkel, 2010). Pour notre étude, un fragment de chaîne composé de 4 ganglions est disséqué, prélevé puis lésé en pinçant l'un des deux connectifs entre chaque paire de ganglions (3 points d'extraction par fragment). Les fragments sont ensuite incubés dans un milieu complet avec un inhibiteur spécifique d'ALK4/5, SB431542 (20 μ M, R & D Systems, Minneapolis MN, USA) ou avec son véhicule (DMSO 100 mM). Les fragments sont montés sur lame Poly-D-lysine (Dominique Dutscher, Brumath, France) à différents temps: 15 minutes (T0), 6 heures (T6h) et 24 heures (T24h) après la lésion et observé sous microscope. La lame de verre est ensuite montée sur une plaque d'adaptation universelle haute précision X-Y. Le site d'extraction protéique est déterminé à l'aide du logiciel Points

LESA. Un volume de 1,5 µl de solution CHAPS (3,5% dans du Tris-HCl 0,1 M, pH 10 et DTT 50 mM) est chargé dans une pointe de cône. Un bras robotique déplace ensuite la pointe de cône au-dessus du point d'extraction précédemment déterminé par microscopie. Une microjonction liquide est alors formée entre l'extrémité de la pointe et le point de lésion avec un volume de 0,4 µl de solvant. Dix cycles d'aspiration/distribution sont effectués sur la lésion sans rompre la jonction liquide. Les protéines provenant des cellules et des espaces intercellulaires à la zone de lésion sont ainsi extraites et stockées dans un tube de collecte. Pour l'analyse protéomique, l'échantillon est déposé sur un gel de polyacrylamide. Après coloration au bleu de coomassie, les bandes d'échantillon sont découpées puis soumises à une réduction, une alkylation et une digestion enzymatique, expliqué par la suite. L'analyse par spectrométrie de masse est enfin réalisée.

10.2.2. Etude protéomique des sous-populations microgliales (ganglions vs. connectifs)

Les cellules microgliales issues des connectifs ou des ganglions sont mises en culture pendant 24h séparément. Puis, les cellules sont culotées par centrifugation à 1200 x g pendant 30 minutes. Les protéines sont ensuite extraites dans un tampon RIPA, protocole déjà décrit précédemment. Les protéines de chaque sous-population microgliale sont déposées sur un gel de polyacrylamide. Après coloration au bleu de coomassie, les bandes sont découpées puis les échantillons sont soumis à une réduction, une alkylation et une digestion enzymatique, comme expliqué par la suite, avant l'analyse par spectrométrie de masse.

10.3. Digestion en gel

Les bandes de gels ont été coupées en petits morceaux de 1 mm³ et lavés avec une succession de solutions : 300 µL d'eau déminéralisée distillée pendant 15 minutes, 300 µL d'ACN pendant 15 minutes, 300 µL de NH₄HCO₃ (100 mM, pH 8) pendant 15 minutes, 300 µL de NH₄HCO₃/Acétonitrile (ACN) (1:1) pendant 15 minutes, puis 300 µL d'ACN pendant 5 minutes. Les morceaux sont séchés sous vide en utilisant un speedvac pendant 5 minutes. La réduction des cystéines est effectuée en utilisant 50 µl

d'une solution de DTT (10 mM) dans du NH_4HCO_3 (100 mM, pH8) et incubée à 56°C pendant 1 heure. L'alkylation des cystéines est effectuée en utilisant 50 μL d'une solution d'IAA (50 mM) dans du NH_4HCO_3 (100 mM, pH8) et incubée à température ambiante dans le noir pendant 30 minutes. Les morceaux sont ensuite lavés avec 300 μL de NH_4HCO_3 (100 mM, pH8) pendant 15 minutes, 300 μL de $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ACN}$ (1:1) pendant 15 minutes et 300 μL d'ACN pendant 5 minutes. Les morceaux sont alors séchés au speedvac pendant 5 min et soumis à une digestion enzymatique en utilisant une solution de trypsine (12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dans du NH_4HCO_3 (20 mM, pH8) et incubés pendant une nuit à 37°C. Les peptides sont ensuite extraits en utilisant la succession d'étapes suivante : 50 μL d'ACN 100% permettant la rétractation de la bande de gel et la sortie des peptides puis 150 μL d'acide formique 1% sont ajoutés afin d'inhiber l'action de la trypsine restant dans le tube, enfin 150 μL d'ACN 100% est ajoutés afin de s'assurer la sortie complète des peptides. Les surnageants sont transférés dans un nouveau tube et séchés au speedvac. Les peptides sont ensuite remis en suspension dans 20 μL d'une solution de TFA 0,1% pour une étape de dessalage.

10.4. Nano LC-HR-MS/MS

Les peptides sont dessalés et concentrés en utilisant des micro-cônes ZipTip C18 (Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, France), puis élués par ACN 80% et séchés sous vide. Les échantillons séchés sont reconstitués dans 20 μL d'un mélange acétonitrile avec acide formique (ACN 2%/98% AF à 0,1%). Les échantillons sont séparés par chromatographie en phase inverse en ligne en utilisant un système Proxeon Easy nLC1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) équipé d'une pré-colonne Proxeon (100 μm ID 2 cm) et d'une colonne phase inverse C18 (Acclaim PepMap, 75 μm ID 50 cm). Les peptides sont séparés en utilisant un gradient d'ACN (5-30% en 120 minutes) à un débit de 300 nL/min. L'éluât de chromatographie est sprayé directement grâce à une tension de 1,7 kV appliquée sur l'aiguille de la source nanospray. Le système de chromatographie est couplé à un spectromètre de masse Q-exactive (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA, USA) programmé en TOP10, fragmentant en MS2 les 10 ions les plus intenses de MS1, cela en mode données dépendantes (DDA). Les acquisitions sont effectuées avec un pouvoir de résolution de 70 000 FWHM (m/z

400), en mode positif et en utilisant une AGC target de 3e6. Un état de charge par défaut de 2 est utilisé et les états de charges non attribués sont rejetés. L'exclusion dynamique est activée pendant 25 s. La plage de balayage est définie entre 300-1600 m/z. Pour l'acquisition MS2, après fragmentation par une énergie de collision normalisée HCD (NCE) de 30, une gamme de masse comprise entre 200 et 2000 m/z est utilisée avec une fenêtre d'isolement de 4 m/z.

10.5. Analyses de données

Toutes les données sont traitées avec le logiciel MaxQuant (version 1.5.6.5) (Cox et Mann, 2008) en utilisant l'algorithme de recherche Andromeda (Cox et al., 2011). Les protéines sont identifiées par méthode bottom-up en soumettant les données brutes issues de spectrométrie de masse (ou MS) et MS/MS de l'analyse peptidique à une base de données protéique prédite et digérée *in silico* d'*Hirudo medicinalis*. Cette base de données est réalisée au laboratoire comme indiqué précédemment à partir de séquences d'ARNm traduites *in silico*. Toutes les séquences de protéines prédites sont annotées par homologie avec la base de données humaine. Au cours de l'interrogation MaxQuant, la trypsine est définie comme mode de digestion avec deux clivages manqués maximum. Les acétylations N-terminales et l'oxydation des méthionines sont définies comme modifications variables, et la carbamidométhylation des cystéines est définie comme modification fixe. Pour l'identification des protéines, un minimum de 2 peptides et au moins 1 peptide unique par protéine est défini comme filtre minimum d'identification. Une p-value pour la correspondance des spectres peptidiques (PSM) est fixé à 0,01 afin de réduire au maximum l'identification de faux positifs. La quantification relative des protéines est effectuée en utilisant l'algorithme MaxLFQ avec les paramètres par défaut. L'analyse statistique des protéines identifiées et de leur valeur de LFQ est réalisée à l'aide du logiciel Perseus (version 1.5.6.0) (Tyanova et al., 2016). Le fichier contenant les informations provenant de l'identification a été utilisé, les contaminants potentiels identifiés ont été supprimés, puis l'intensité de la valeur LFQ transformée par $\log_2 [x]$. Des catégories regroupant les échantillons d'un même triplicat sont réalisées afin de faciliter l'annotation des colonnes.

Un test ANOVA est réalisé avec une valeur de p-value de 5% permettant de mettre en évidence les protéines possédant une variation spécifique de leur valeur LFQ (Label-free quantification). Seules les protéines présentant un résultat significatif après le test ANOVA ont été gardées. Un regroupement hiérarchique est effectué permettant de représenter de manière graphique (Heatmap) les variations de LFQ observées entre les échantillons et regroupant celles-ci sous forme de cluster. L'annotation fonctionnelle et la caractérisation des protéines identifiées dans les clusters de surexpression du heatmap ont été obtenues à l'aide des logiciels PANTHER (version 13.0) (Mi et al., 2017) et STRING (version 9.1) (Szklarczyk et al., 2015). Une analyse par diagramme de Venn a été effectuée à l'aide de «Draw venn diagram», un outil Web pour l'analyse d'ensembles de données complexes. L'analyse des GO termes (Gen Ontology), des composants cellulaires et des processus biologiques a été réalisée avec l'outil d'analyse FunRich 3.0 (Pathan et al., 2015).

11. Etude du dialogue médié par des vésicules :

11.1. Enrichissement des Vésicules Extracellulaires (VEs)

Le milieu conditionné issu des cultures primaires de cellules microgliales est récupéré dans un Tube stérile de 1,5 ml puis subit plusieurs centrifugations à 4°C, sans congélation préalable des échantillons, pour l'enrichissement des vésicules extracellulaires. Une première centrifugation de 10 minutes à 1200 x g permet de culoter les cellules microgliales. Le surnageant (S1) est transféré dans un tube stérile. Il est centrifugé de nouveau pendant 20 minutes à 1200 x g pour éliminer les corps apoptotiques (culot). Le surnageant (S2) issu de cette centrifugation est filtré (0,22 µm) pour éliminer les grandes vésicules et les débris encore présents dans le surnageant et transféré dans des tubes en polycarbonate adaptés pour l'ultracentrifugation (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Les tubes sont complétés avec du PBS jusqu'à un volume final de 9 ml. Les échantillons sont ultracentrifugés pendant 90 minutes à 100 000 x g sur un rotor 70.1 Ti (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Les surnageants (S3) sont éliminés délicatement puis le culot de vésicules est resuspendu dans 200 µl de PBS. Les vésicules extracellulaires sont de nouveau ultracentrifugées comme décrit

précédemment. Les surnageants (S4) sont éliminés et le culot vésiculaire est remis en suspension dans 200 µl de PBS pour des analyses ultérieures. Les vésicules sont quantifiées à l'aide d'un compteur de nanoparticules NanoSight NS300 (Malvern analytical Ltd, Malvern, Royaume-Uni) selon les instructions du fabricant.

11.2. Croissance neuritique

Les développements au laboratoire ont démontré que les neurones entre 6 et 20 µm présentent une meilleure croissance neuritique. Ainsi, ils sont filtrés avec un filtre PluriStrainer de 20 µm (Dominique Dutscher, Brumath, France) et mis en culture primaire selon les conditions déjà décrites, dans un milieu complet L15 déplété en exosomes. Après 6 jours de culture, les neurones sont traités soit avec le surnageant S3, soit des vésicules extracellulaires (10^6 VEs/puits), soit les vésicules + l'inhibiteur de la voie de signalisation ALK4/5 (20 µM) (Inman et al., 2002). Le surnageant S3 est utilisé ici comme contrôle négatif contenant les facteurs solubles présents dans le milieu conditionné des cellules microgliales. Ensuite, les images de culture sont prises sous microscope confocale Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Minato, Tokyo, Japan). Le microscope est équipé d'une platine motorisée lui permettant des prises de vue en mosaïque de toute la culture avec mise au point automatique. Les images sont effectuées aux jours de culture 6 (T0 pour la stimulation), 13 et 20. Seuls les neurones montrant une croissance jusqu'au jour 20 sont pris en compte pour les analyses. Les cellules sont toutes analysées individuellement pour établir leur croissance neuritique au cours des trois temps à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel GraphPad en utilisant un test Anova «two way».

ANALYSE PROSPECTIVE
ET OBJECTIFS DE THESE

Comme évoqué précédemment, la sangsue *Hirudo medicinalis* a plusieurs particularités qui font d'elle un excellent modèle de recherche. Elle facilite l'étude des processus de régénération axonale après une lésion. De plus, en raison de l'infiltration insignifiante des cellules sanguines dans le SNC après une lésion, les cellules microgliales résidentes peuvent être plus aisément étudiées.

En outre, les résultats antérieurs ont montré que l'accumulation microgliale chez *H. medicinalis* sur le site de lésion permet un meilleur déclenchement des phénomènes de repousse axonale (Ngu et al., 2007). Ces données suggèrent ainsi un phénotype neuroprotecteur naturel des cellules microgliales résidentes chez la sangsue et un rôle important dans la réparation fonctionnelle de son SNC.

C'est dans ce contexte que dans notre laboratoire nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le recrutement des cellules microgliales à la lésion. En même temps, nous recherchons également à comprendre le dialogue, qui semble être neuroprotecteur, entre les cellules microgliales et les neurones menant à la repousse axonale et la synaptogenèse. L'étude du recrutement des cellules microgliales a consisté à rechercher des marqueurs spécifiques pour ces cellules.

Dans un premier temps, notre intérêt s'est donc focalisé sur la recherche des signatures moléculaires particulières des cellules microgliales résidentes du SNC. En nous inspirant des marqueurs spécifiques des cellules microgliales résidentes qui ont été proposés chez le rongeur par Butovsky et ses collaborateurs (Butovsky et al., 2014), nous avons réalisé une étude prospective pour rechercher des similitudes dans la microglie résidente de sangsue, qui n'est pas naturellement touchée par une infiltration massive de cellules immunitaires sanguines.

Les travaux de Butovsky *et al.* ont permis d'identifier une série de molécules semblant exclusives ou hautement enrichies (Butovsky et al., 2014). En utilisant les banques de données génomique et transcriptomique de la sangsue, des homologues de ces molécules ont été recherchés. Cette recherche a permis d'établir une liste préliminaire des molécules candidates apparentées aux formes humaines de ces marqueurs (Tableau 1).

Tableau 1: Résultat de l'interrogation des banques de données (pour des raisons de fluidité dans la lecture des abréviations, les noms entiers ont été maintenus en anglais)

| Protéine | Gène | Numéro d'accèsion (Uniprot) |
|--|---------|-----------------------------|
| Fc receptor-like 5, scavenger receptor | Fcrl5 | Q9EQY5 |
| Vitamin K-dependent protein 5 | Pros1 | P07225 |
| Growth arrest-specific protein 6 | Gas6 | Q14393 |
| Beta-hexosaminidase subunit beta | Hexb | P07686 |
| Legumain | Lgmn | Q99538 |
| Tyrosine-protein kinase Mer | Mertk | Q12866 |
| Olfactomedin-like protein 3 | Olfml3 | Q9NRN5 |
| Sal-like protein 1 | Sall1 | Q9NSC2 |
| TGF-beta receptor type-1 | Tgfr1 | P36897 |
| Transmembrane protein 119 | Tmem119 | Q4V9L6 |

D'après cette liste potentielle de molécules présentes chez la sangsue, sur la base de leur conservation de séquence, trois molécules candidates ont été sélectionnées : le récepteur de type I au TGF- β (TGF- β R1), l'hexosaminidase B (HexB) et la légumine. Ces trois molécules ont été étudiées dans des expériences d'hybridation *in situ*, pour avoir une première idée de la localisation de leur ARNm dans le système nerveux. Les expériences montrent des signaux spécifiques sous des conditions expérimentales de réponse 24h après à la lésion (Figure 18). Les ribosondes sens utilisées comme contrôles négatifs (Figures 18G,H,I) ne montrent pas de signal significatif dans les cellules observées hormis une légère fixation aspécifique en surface des tissus conjonctifs entourant le système nerveux.

Ces premiers résultats ont montré que l'ARNm codant pour HexB est présent dans certains neurones de plus petite taille que les autres (Figure 18F). Il a été possible également de le détecter dans certaines cellules microgliales en déplacement dans les connectifs (Figure 18C). Concernant, l'ARNm codant la protéine légumine, il est présent dans la zone entourant les neurones dans les ganglions nerveux (Figure 18E).

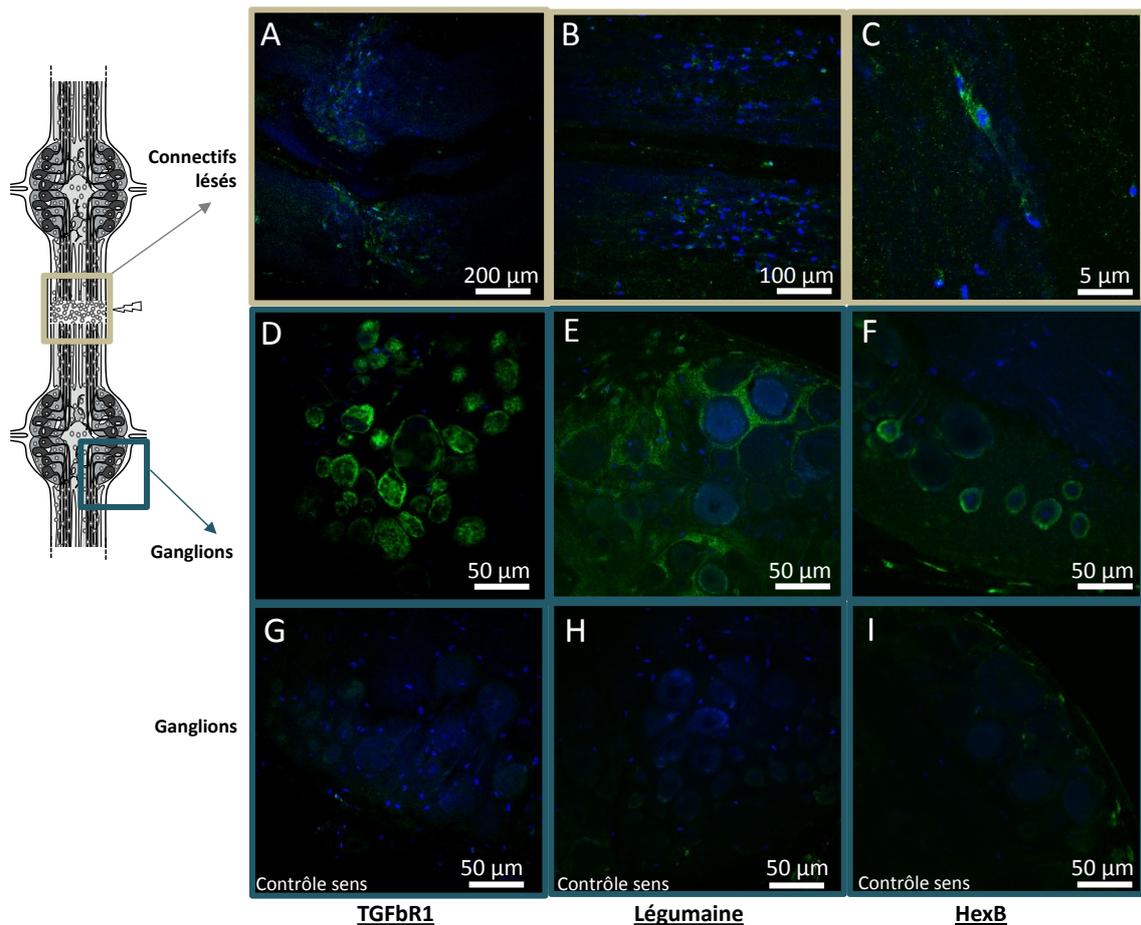


Figure 18 : Hybridation in situ de TGF-β R1, Légumine et HexB dans des fragments de SNC. Images de microscopie confocale à fluorescence obtenues après hybridation in situ (FISH) dans le fragment de SNC lésé au milieu des connectifs (voir schéma). Les ribosondes (en vert) utilisées respectivement sur des fragments de système nerveux lésés sont dirigées contre trois ARNm codant : TGF-β R1 (à gauche) légumine (milieu) et hexosaminidase B (HexB) (à droite). (G-I) Les sondes sens ont été utilisées comme contrôle négatif. Les images sont des agrandissements (A-C) de la zone de lésion et (D-I) de ganglion nerveux, comme indiqué sur le schéma de gauche.

Ce signal comble l'intégralité des espaces inter-neuronaux sans véritables contours cellulaires comme les auraient dessinées des cellules microgliales. Ceci suggère une localisation dans les cellules gliales du paquet ou la libération dans cet ARNm dans l'espace extracellulaire, ce qui est moins probable. En outre, l'analyse de la zone de lésion dans les connectifs ne révèle pas de marquage important, alors même que de nombreux noyaux en bleu sont présents et montrent l'accumulation microgliale (Figure 18B). Il est donc possible que quelques cellules microgliales puissent renfermer cet ARNm codant la légumine mais en nombre très limité. Dans cette étude, l'ARNm codant pour la molécule apparentée au TGF-β R1 est présent dans la zone de lésion où s'accumulent les cellules microgliales visualisées ici par un marquage nucléaire en bleu

(Figure 18A). Cette colocalisation de l'ARNm avec la microglie accumulée suggère un marquage microglial. En effet, il n'existe pas dans cette zone de lésion une autre population dont les corps cellulaires pourraient présenter ce signal. De plus, dans les ganglions nerveux cette fois-ci, ce transcrite est également détecté dans certains neurones (Figure 18D). Par conséquent, les résultats du marquage HexB et Légumine sont intéressants mais ne suggèrent qu'un signal limité dans la microglie. Les résultats concernant la molécule homologue au récepteur de type I au TGF- β sont plus intéressants car ils suggèrent la présence de cet ARNm dans une population microgliale plus vaste et recrutée à la lésion. Ils ont donc attiré notre attention pour la suite de ce travail.

La présence de ce récepteur chez la sangsue représente un grand intérêt dans la compréhension de la microglie résidente dite neuroprotective. Les ligands de ce récepteur, les membres de la famille TGF- β , sont décrits comme des cytokines neuroprotectrices associées au phénotype microglial anti-inflammatoire de type M2 (Lan, Han, Li, Yang, & Wang, 2017). Cette cytokine est aussi un modulateur positif de la réponse en cas de lésion et participe au contrôle des cellules microgliales restées dans un état d'immunosurveillance (Abutbul et al., 2012; Hanisch & Kettenmann, 2007). Elle pourrait être essentielle pour prévenir l'activation aberrante de la microglie et les lésions neuronales graves.

Il a été démontré non seulement que la famille TGF- β est essentielle pour le maintien de la signature microgliale (Butovsky et al., 2014), et qu'elle peut également induire la transcription de certains gènes spécifiques de la microglie dans les cellules macrophagiques via les récepteurs de type I et II au TGF- β (Gosselin et al., 2014). Une étude récente a montré que le TGF- β , le cholestérol et le CSF1 sont sécrétés par les astrocytes et que ces derniers vont soutenir fortement la survie microgliale *in-vitro* (Bohlen et al., 2017). De plus, dans le même temps que le début de notre étude, la cytokine TGF- β a été décrite comme un régulateur clé de l'expression neuronale de C1q au cours de la neurogenèse (Bialas & Stevens, 2013), une protéine du complément déjà décrite pour recruter la microglie nécessaire à l'élagage synaptique (Stevens et al., 2007).

En tenant compte de ce contexte, nous avons décidé de concentrer ce travail sur la présence du récepteur de type I au TGF- β chez la sangsue. Les résultats suggèrent que l'ARNm de ce récepteur est présent dans les cellules microgliales à la lésion et aussi dans certains neurones, ce qui exclut la possibilité que ce récepteur puisse avoir un rôle de marqueur exclusif de la microglie chez la sangsue. Néanmoins, ces résultats évoquent plusieurs hypothèses. Si les deux types cellulaires expriment le gène codant ce récepteur, existe-t-il une molécule de la famille TGF- β chez la sangsue qui pourrait être son ligand? Si elle existe, pourrait-elle avoir un rôle dans la chimioattraction des cellules microgliales à la lésion et engager un dialogue mutuel dépendamment de cette signalisation entre la microglie recrutée et les neurones lésés ?

Mon travail de thèse s'oriente donc vers l'étude de la signalisation dépendante du récepteur de type 1 au TGF- β (TGF- β R1) en tenant compte des spécificités de la chaîne nerveuse organisée en ganglions et en connectifs. En effet, le dialogue entre cellules microgliales et neurones sera distingué selon que les cellules microgliales des connectifs interagissent avec les axones lésés et que les cellules microgliales ganglionnaires interagissent avec les corps cellulaires neuronaux. La première partie de mon projet a consisté à caractériser le récepteur de type 1 au TGF- β chez la sangsue, nommé ALK4/5 pour ses homologues, puis à rechercher ses ligands. Il est devenu ensuite intéressant de comprendre les fonctions d'une telle signalisation dans un contexte de lésion et d'activation microgliale. Grâce à la structure de la chaîne nerveuse, un tout premier dialogue précoce a été détecté au point de la lésion entre la microglie des connectifs et les axones lésés, et un second plus tardif entre la microglie ganglionnaire et les corps cellulaires neuronaux. Par la suite, nous avons souhaité préciser les signatures protéiques mises en jeu à la lésion au cours du temps et cela, dans un environnement dépendant d'ALK4/5. L'étude de ces événements chronologiques pourrait conduire à une meilleure compréhension du dialogue initié entre microglies et neurones. Enfin, les résultats ont confirmé ce qui était déjà suggéré par d'autres études du laboratoire, à savoir la production importante de vésicules extracellulaires (exosomes et microvésicules) dans la zone de lésion axonale mais aussi dans les ganglions nerveux. En rassemblant ces données, nous avons suivi l'implication de la famille TGF- β dans le rôle neurotrophique porté par les vésicules extracellulaires.

RESULTATS

1. Etude du dialogue dépendant du récepteur de type 1 au TGF- β (ALK4/5) chez la sangsue

1.1. Caractérisation d'un récepteur de type 1 au TGF- β

L'interrogation, par analyse locale BLAST, des banques de données génomique et transcriptomique de sangsue avec la forme humaine du récepteur de type 1 au TGF- β (TGF- β R1) a révélé l'existence d'une séquence putative apparentée à TGF- β R1. Depuis notre analyse prospective, cette séquence faisait l'objet d'une attention particulière. En effet, un fragment interne avait été amplifié de façon à construire une ribosonde spécifique et localiser l'ARNm dans le système nerveux (Figure 19). Afin de caractériser la séquence complète de ce transcrit, d'autres amorces spécifiques ont permis d'amplifier par RACE-PCR la moitié 5' et la moitié 3' de l'ARNm. Après clonage, séquençage et chevauchement de ces séquences, la séquence complète de l'ARNm a été reconstruite. Constituée de 1990 nucléotides, cet ARNm code pour une protéine de 503 acides aminés avec une masse moléculaire théorique déduite de 56953 Da (Figure 19).

Ce récepteur compte plusieurs ponts disulfures marqués en gris sombre dans la Figure 19. Certains de ces ponts disulfures sont communs aux différents récepteurs de types I et II au TGF- β : Cys28-Cys49, Cys43-Cys66, Cys81-Cys95 et Cys96-Cys102. Un pont disulfure a été décrit comme spécifique au récepteur de type I : Cys30-Cys36 (Boesen, Radaev, Motyka, Patamawenu, & Sun, 2002). De plus, la séquence possède un domaine GS d'environ 30 acides aminés portant au milieu un motif SGSGSG (marqué en gris clair dans la Figure 19). Ce motif caractéristique du récepteur de type I est indispensable à son activation car il contient les sites de phosphorylation ciblés par le récepteur de type II (Attisano, Wrana, Montalvo, & Massagué, 1996; Wieser, Wrana, & Massagué, 1995). Une fois activé, l'hétérodimère serait capable de propager le signal. Il a été démontré que la mutation de deux résidus altère l'activité de phosphorylation et de signalisation (Attisano et al., 1996; Wieser et al., 1995).

```

1      gacatccttattctataataaaaaacataccgtaagtgtgctcgcggttatgagctcctcatatgc
                                     M S L I C 5
61     cgcagtggtatggttatttagtggttattctctgcttagtttgcgcaactagagttgagcta
R S G W L F S V I L L L S F A T R V E L 25
121    ttgaaatgtaaatgttctaaagggagagaatgtggaaaaaacagcaccacttgcaccact
L K C K C S K G R E C G K N S T T C T T 45
181    gaggggtctgttttgcattaacctacataaagaatctcttgtttacaacaaattatgga
E G V C F A L T Y I K K S L V T T N Y G 65
241    tgtttccatccagaggtctgttacctgctggtaatccaatgatttgcctatgacaatgaa
C F H P E V L L P A G N P M I C Y D N E 85
301    caaaaaacattttttgaaaagaggaagtgttgctgggtccaaggattatgcaatgctgaa
Q K T F F E K R K C C W S K D Y C N A E 105
361    cctgaaaaccaaccaacattggctcctttaccgacaacaactttggccaagacactcta
P E N H P T L A P L P T T T F G Q D T L 125
421    gttttgggtggactgtgogtttcaactacaataatcttctgctccttgccttctgggtgct
V L V G L C V S L L T I I F V L L L L V A 145
481    gcaatatattgggtccagcatagaaagtccagctgataaaaaatgattctctgacatgcaat
A I Y W C Q H R K V Q L M K N D S D D H 165
541    ctgataccaagcactccaacagacatcaagactgatattttctctcagaattctggg
L I P S T P T D I K T D I S F S Q N S G 185
601    tcagggttcaggactaccctgttccatgccaatgaccattgcaagcaaaattctctggac
S G S G L P L F M P M T I A R Q I S L D 205
661    accatagttggcactggaaggtatggagaagtgtggagggtgtaaggaggagtgagtat
T I V G T G R Y G E V W R G V W R S E Y 225
721    gtgacagtgaagattttccattcaagagaagaaaggctgtggctcgcagaagctcagta
V A V K I F H S R E E R S W S R E A Q V 245
781    tatcagactgttatgctgagacatgacaacattcttgggttcattgctgcagacaacaa
Y Q T V M L R H D N I L G F I A A D N K 265
841    gataatggaacgtggacacagctctgggttagtcacagactatcatcctcatggaagtctg
D N G T W T Q L W L V T D Y H P H G S L 285
901    tttgactacttgaaatcggcaacaataacaatgcaatgcttcagatgctcctgagc
F D Y L N S A T I N I Q V M L Q M L L G 305
961    atttccaatggactggctcatcttcatatggaaaatattggaccagggaacactgga
I S N G L A H L H M E I I G T Q G K P G 325
1021   atgacacagagactggaagtcaagaacatcctgggtgaaaacaactgcaggtgtgc
I A H R D L K S K N I L V K N N L Q C C 345
1081   attgcagactgggactggcagtaaaacatgactcagagtcagataaagtcgacatagca
I A D L G L A V K H D S E S D K V D I A 365
1141   agcaacaacagagtgggcagtgagatcacatggctccagaaattattcaagacatgatt
S N N R V G T V R Y M A P E I I Q D M I 385
1201   gacccaagcaaaattttaggatccaacaggcagacatttactcccttgcacttgtgttt
D P S K F V G F K Q A D I Y S L A L V F 405
1261   ttggagattatgagaagatgtgatgaattgggtcctcctgaggaataccagttgccat
W E I M R R C D E L G P P E E Y Q L P Y 425
1321   tatgatgtgtgccatctgatccaacgcagaagagatgttgaaggctgttgtgattgat
Y D C V P S D P T H E E M L K A V V I D 445
1381   caaaaacgtccacagataccaagggagtggatgggaaaataagacattcactggagtaacc
Q K R P Q I S R E W M G N K T F T G V T 465
1441   agcataatgcatgagtggtggtcaaatttccctagtggtgaggggtgaagccctgagagtc
S I M H E C W S N F P S V R V E A L R V 485
1501   aagaagtctcttatgaagataattgagaatcacaacacacagcagctaacagcatgaggg
K K S L M K I I E N H N T Q Q L T A 503
1561   gtggagtccttatccaacttggatggcagaatgctaattacgtgtgaaatataatgcctctga
1621   cgcactaatgacaaaatctttgtgaaaaattcttatctgtaagggccatcacccctcaa
1681   ttgttttgatttctgcacttattatataattcatttctaagatgttttcaaaaacatctc
1741   aattgaactttgttattgaccggatcgtgtgctggctgagggcttaaaaattggaattga
1801   tacctggaggaattaatatgagcccatatattggcaattctgttctttttgaaattgc
1861   cgttgaagaacccttttgcctctgtttgtaaatttgatgatacttttaattgatgatgcttt
1921   gcctcttggcagagatgtgcttgcatttttaaaaaataaatttgagatgtgctttaaaaaaa
1981   aaaaaaaaaa

```

Figure 19: Caractérisation de la séquence en nucléotides et en acides aminés du récepteur ALK4/5, récepteur de type 1 au TGF-β chez la sangsue. La numérotation des nucléotides est indiquée à gauche et celle des acides aminés à droite. Les cinq ponts disulfures sont surlignés en gris foncé. Deux régions surlignées en gris clair représentent le domaine GS et le motif de la boucle L45.

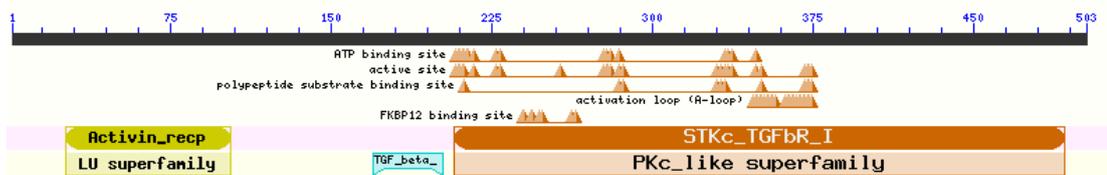
Tout cela confirme que ce récepteur est bien un récepteur de type I. Il existe sept récepteurs de type I au TGF-β: nommés ALK1/2/3/4/5/6/7 (ALK pour Activin receptor-

Like Kinase). Les récepteurs ALK1/2/3/6 activent une voie SMAD 1/5/8 alors que ALK 4/5/7 activent la voie SMAD 2/3 (Graham & Peng, 2006).

Enfin, le récepteur de type I caractérisé chez la sangsue possède un motif structurel de boucle L45 (marqué en gris claire dans la Figure 19). En fonction de sa séquence en acides aminés, cette boucle joue un rôle essentiel dans la sélectivité de l'interaction avec les protéines et dans la signalisation intracellulaire spécifique. Il a été démontré que cette boucle L45 de 9 acides aminés (ADNKDNGTW), située dans le domaine kinase, est spécifique des récepteurs du sous-groupe Activin receptor-Like Kinase 4, 5 ou 7 » (ALK4/5/7) (Feng & Derynck, 1997; Persson et al., 1998). De ce fait, il est spécifique de l'activation de la voie Smad2/3. A ce stade, nous devrions attribuer notre récepteur de sangsue à ce groupe ALK4/5/7. Des études récentes portant sur les affinités entre ligands et récepteurs montrent que ce groupe ALK4/5/7 reconnaît les ligands de la famille TGF- β tels que TGF- β 1, GDF8 (Myostatine), GDF11, activine A et activine B. En revanche, ALK7 a pour ligand naturel préférentiel l'activine B et possède une affinité 4 à 5 fois plus faible pour les autres ligands (Khalil et al., 2016; Tsuchida et al., 2004). Nous verrons plus bas que le membre de la famille TGF- β caractérisé chez la sangsue et présent dans le système nerveux correspond à un orthologue de GDF8/11. C'est la raison pour laquelle, à la connaissance de nos résultats, nous avons souhaité nommer le récepteur caractérisé ALK4/5 conformément à nos observations.

La séquence en acides aminés possède des domaines conservés caractéristiques des récepteurs de la famille TGF- β (Figure 20A). Entre lequel on observe, le motif des récepteurs d'activine I et II, domaine riche en cystéines importante pour la liaison au ligand ; le motif GS, caractéristique de récepteur de type I ; le motif TGFBR1, un motif catalytique des serine/thréonine kinases ; et finalement le motif protéine tyrosine kinase (Figure 20A). De plus, les comparaisons aux banques de données swissprot ont montré que ce récepteur de type I au TGF- β est homologue au récepteur de type I au TGF- β ou ALK5 (UniProtKB P36897) et au récepteur ACVR-1B ou ALK4 (UniProtKB P36896). L'alignement des séquences des deux récepteurs ALK5 et ALK4 humains présente 64% et 65% d'homologie (52% et 53% d'identité) respectivement avec la séquence protéique du récepteur caractérisé chez la sangsue (Figure 20B).

A MH346327



B

| | 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | |
|----------|-------------|---------|--------|-------|---------|--------|--------|-------|-------|--------|--------|
| P36897 | MEARVAAPRPR | LLLLVLA | AAAAA | ALLPG | ATALQCF | CHLCTK | DNFTCY | TDLG | CFVSV | TETTKV | IHNSMC |
| P36896 | MAESAGASSF | PFLV | LLLLAG | SGSG | SPRGV | ALLCA | CTSC | LQANY | TC | TGAC | MVSI |
| MH346327 | MSLICRSG | MLFSV | LLLLSF | ATRV | ELLK | --- | CKSK | GRE | CGKN | STCT | TTEG |
| | | | | | | | | | | | |
| | 91 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | |
| P36897 | KTGSV | TYCC | NQ-DHC | NKIEL | -- | PTTV | KSS | PG--- | LGP | VELA | RV |
| P36896 | --- | DLRN | THCC | YTDY | CNR | IDL | RV | PS | GH | LKE | PE |
| MH346327 | QKTFE | KRCC | SKSDY | CNA | EPEN | HPT- | LAP | LPT | TT | F | Q |
| | | | | | | | | | | | |
| | 181 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | |
| P36897 | SEG | TLK | DL | LYD | MTT | SG | SG | S | GL | PL | L |
| P36896 | SKDK | TLQ | DL | LYD | LST | SG | SG | S | GL | PL | F |
| MH346327 | STP | TDI | K | TDI | S | F | S | Q | N | S | G |
| | | | | | | | | | | | |
| | 271 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | |
| P36897 | FIA | ADN | K | D | G | T | H | T | Q | L | V |
| P36896 | FIA | ADN | K | D | G | T | H | T | Q | L | V |
| MH346327 | FIA | ADN | K | D | G | T | H | T | Q | L | V |
| | | | | | | | | | | | |
| | 361 | 370 | 380 | 390 | 400 | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | |
| P36897 | LGL | AVR | H | D | S | A | T | I | D | I | A |
| P36896 | LGL | AVR | H | D | A | V | T | I | D | I | A |
| MH346327 | LGL | AVK | H | D | S | E | S | D | K | V | D |
| | | | | | | | | | | | |
| | 451 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 | 510 | 515 | | | |
| P36897 | RK | V | Y | C | E | Q | K | L | R | P | |
| P36896 | RK | V | Y | C | E | Q | K | L | R | P | |
| MH346327 | LK | A | V | I | D | Q | K | R | P | I | |

Figure 20: Caractérisation bio-informatique de ALK4/5 un récepteur de type I au TGF- β . (A) Séquence protéique montrant les motifs conservés d'ALK4/5 chez *Hirudo medicinalis*, tel que : le motif des récepteurs d'activine I et II (jaune), le motif riche en GS (bleu), le motif catalytique STKcTGFBR. (B) Alignement de la séquence du récepteur ALK4/5 chez *Hirudo Medicinalis* (MH346327) avec celles du récepteur humain de type I du TGF- β (ALK5, P36897) et du récepteur humain de type Activine I (ALK4, P36896). Les consensus hauts et bas sont représentés par des résidus rouges et bleus, respectivement.

Ces résultats nous ont permis de caractériser un récepteur de type I au TGF- β comme un orthologue de type ALK4/5 (numéro d'accension Genbank MH346327). Même si tout au long de mes travaux de thèse, nous nous sommes concentrés sur le récepteur de type I au TGF- β et son potentiel ligand, d'autres expériences préliminaires ont été initiées pour caractériser d'autres membres de la voie TGF- β chez la sangsue, notamment le récepteur de type II ainsi qu'un de ses partenaires associés en aval, SMAD2/3. Ils seront développés plus bas dans un chapitre indépendant.

1.2. Localisation de l'ARNm dans le SNC chez la sangsue

Afin de localiser l'ARNm codant le récepteur ALK4/5 dans le SNC de sangsue, des expériences d'hybridation *in situ* ont été réalisées. Des conditions de réponse à la lésion (24h post-lésion) ont été privilégiées afin de faciliter l'observation de l'ARNm dans la microglie accumulée au niveau de la lésion.

L'utilisation de la même ribosonde spécifique utilisée par avant dans l'approche prospective a permis de détecter le signal dans les ganglions et dans les connectifs. L'ARNm *alk4/5* est présent dans de nombreux corps cellulaires neuronaux situés dans les ganglions (Figure 21A).

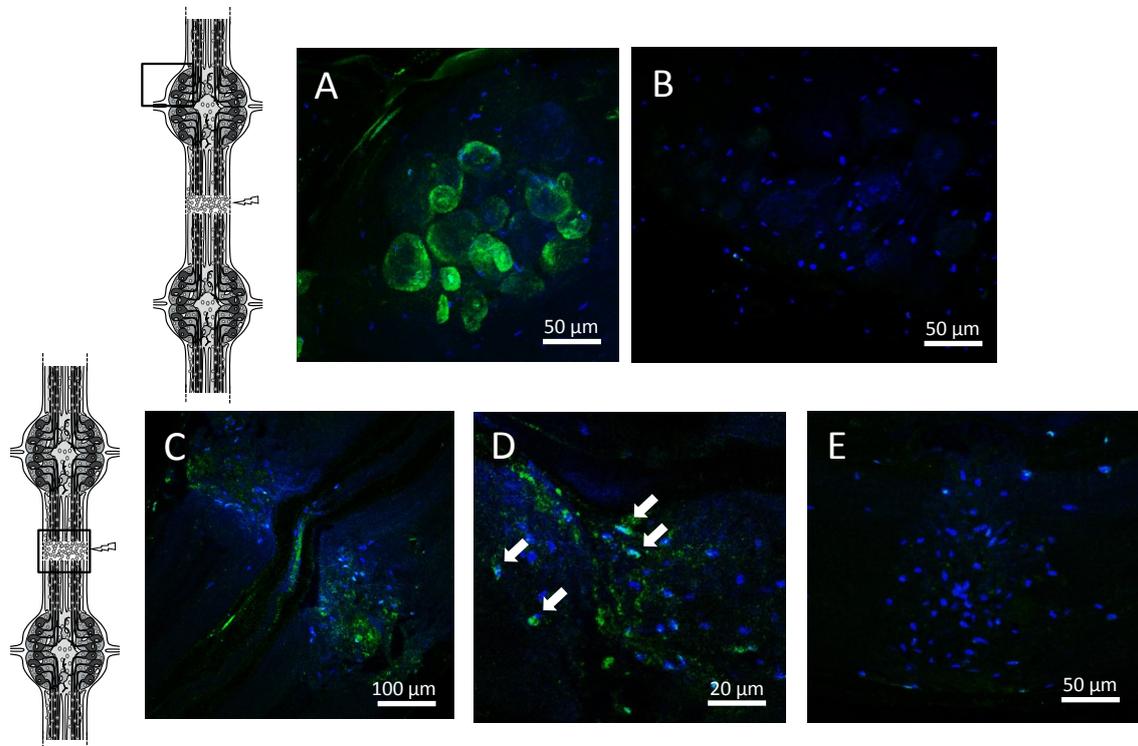


Figure 21: Hybridation *in situ* par fluorescence d'ALK4/5 dans des fragments de SNC. Un fragment de SNC 24h après la lésion au milieu des connectifs (voir schéma) a été utilisé. Les images de microscopie confocale montrent la localisation de l'ARNm *alk4/5* à l'aide d'une ribosonde anti-sens (vert) dans le ganglion (A) et dans le connectif (C-D), comme indiqué par les encadrés dans les schémas du fragment (à gauche). (D) Sur cette vue agrandie de la lésion, les flèches indiquent plus précisément les cellules microgliales positives pour l'ARNm *alk4/5* au point de lésion. (B et E) Les contrôles négatifs utilisant une sonde sens n'ont détecté aucun signal. Les noyaux cellulaires (bleu) ont été révélés au Hoechst 33342 et présentent un signal bleu intense de petite taille pour les cellules microgliales et plus grand et diffus pour les neurones.

Concernant les connectifs, un signal positif est observé au point de la lésion à la position exacte de l'accumulation des cellules microgliales (Figure 21C). De manière intéressante, l'observation de différents plans focaux montrent que ce signal ne

correspond pas à la totalité des cellules microgliales. Seulement certaines cellules microgliales contiennent les ARNm *alk4/5* par rapport à la totalité de la microglie accumulée, visible à l'aide d'un marquage nucléaire (Figure 21D). Dans les ganglions et les connectifs, le contrôle négatif utilisant une sonde sens ne présente aucun signal (Figures 21B et E).

La présence de l'ARNm *alk4/5* dans les neurones et dans les cellules microgliales suggère déjà un type de communication dépendant de ce récepteur, et probablement entre les deux types cellulaires, qui sera confirmé a posteriori. De manière intéressante, la distribution de l'ARNm *alk4/5* dans certaines cellules microgliales suggère qu'une sous-population de cellules microgliales puisse produire et exposer ce type de récepteur pour être recrutée à la lésion. La localisation de l'ARNm *alk4/5* dans une partie des neurones et de la microglie doit être élucidée fonctionnellement.

1.3. Localisation protéique du récepteur ALK4/5 dans le SNC

Nous avons observé qu'une partie des cellules microgliales accumulées contient l'ARNm *alk4/5*. De ce fait il est intéressant d'étudier la localisation de la protéine ALK4/5 au point de la lésion, pour confirmer la présence d'une sous-population ALK4/5⁺. Pour cela, des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur la chaîne nerveuse. Les résultats montrent certaines cellules positives pour le récepteur ALK4/5, confirmant ainsi la présence d'une sous-population de cellules microgliales ALK4/5⁺ recrutée à la lésion (Figure 22A). Ceci est concordant avec la présence de l'ARNm *alk4/5* dans certaines cellules et non dans la totalité de la microglie accumulée. Même si les autres cellules microgliales accumulées, visibles grâce au marquage nucléaire, ne sont pas positives pour la protéine ALK4/5 (Figure 22B), la présence de ce récepteur sur une sous-population suggère qu'il puisse servir avec son ligand comme signal chimiotactique au même titre que les autres mécanismes chimiotactiques déjà décrits dans des études antérieures (Croq et al., 2010; Schikorski et al., 2009; Tahtouh et al., 2009). Un contrôle négatif utilisant l'anticorps secondaire seul n'a montré aucun marquage (figure 22C). Cette expérience a également montré un marquage immunopositif pour ALK4/5 dans les axones, lequel sera étudié ultérieurement (Figure 22A).

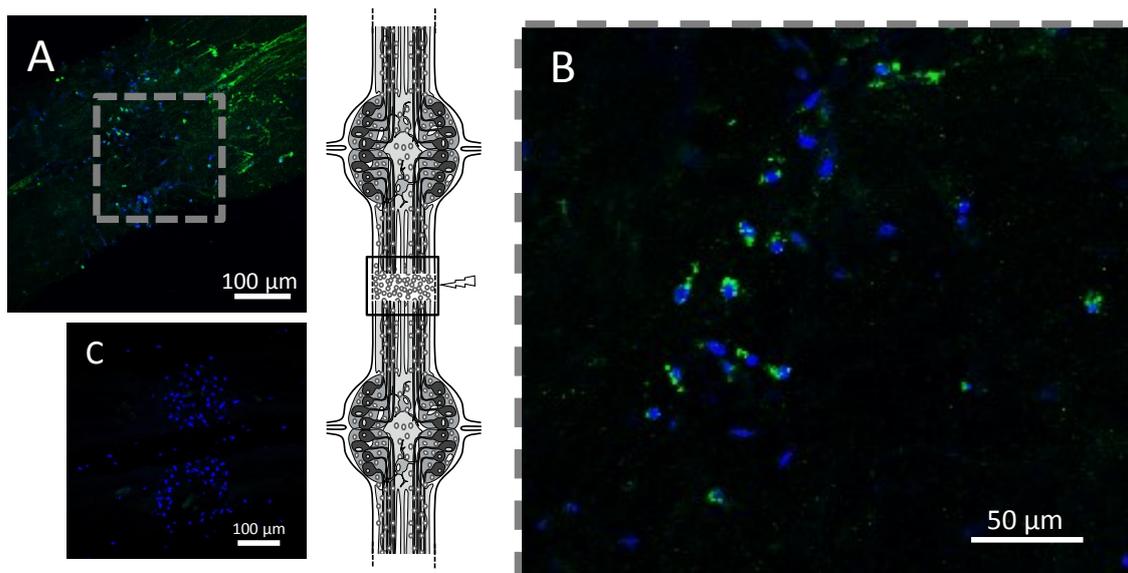


Figure 22: Analyse par microscopie confocale de l'immunofluorescence ALK4/5 dans des fragments de SNC. (A) Site de la lésion observé 6h après la lésion (agrandissement de la zone de lésion indiquée par le schéma). (B) Grossissement du cadre (en A) montrant le marquage des cellules microgliales observée au point de la lésion (vert). (C) Aucun signal n'a été détecté dans le connectif traité uniquement avec un anticorps secondaire en tant que contrôle négatif. Les noyaux cellulaires sont révélés par le marqueur nucléaire Hoechst 33342 (bleu).

1.4. ALK4/5 est impliqué dans le chimiotactisme de la microglie

Pour confirmer que cette sous-population microgliale ALK4/5⁺ utilise le récepteur ALK4/5 dans son recrutement au point de la lésion, des expériences de chimiotactisme *in vitro* ont d'abord été effectuées. L'objectif de cette expérience est de mesurer la réactivité des cellules microgliales fraîchement isolées à des concentrations croissantes de la forme recombinante de TGF-β 1 humain. Ces expériences *in vitro* ont été réalisées en triplicat en utilisant un test horizontal en gélose selon Kohidaï (Köhidaï, 1995) (Figure 23A). Des boîtes de pétri contenant deux puits, l'un avec les cellules microgliales et l'autre avec le TGF-β humain recombinant, sont incubées une heure de façon à ce que les cellules réactives aux différentes concentrations de TGF-β humain recombinant puissent être attirées par chimiotactisme jusqu'au puit du TGF-β pour être enfin récupérées et comptées sous microscope.

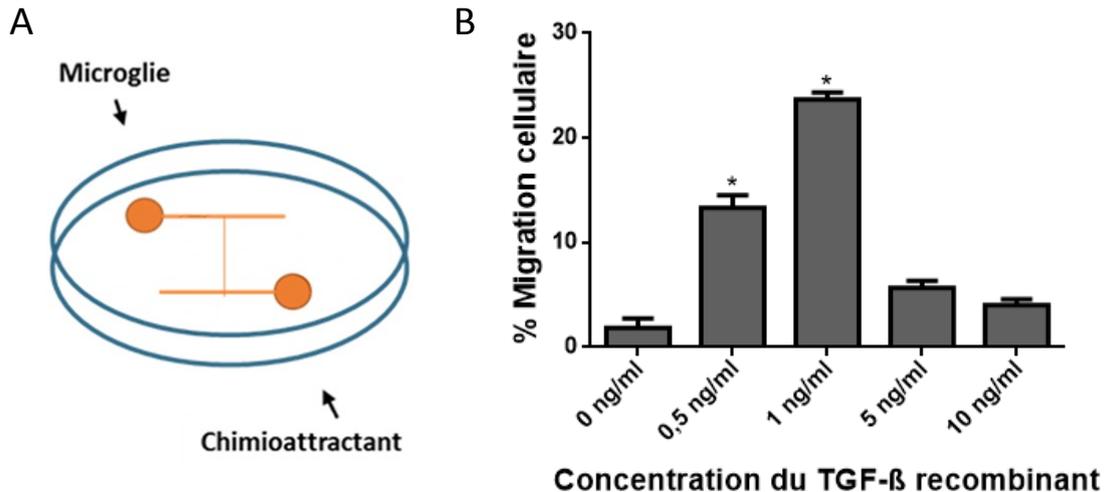


Figure 23: Effet chimiotactique du TGF-β humain recombinant sur les cellules microgliales. (A) Représentation graphique du test de chimiotactisme selon Kohidai (Kohidai, 1995). (B) Effet chimiotactique de différentes concentrations du TGF-β humain recombinant sur les cellules microgliales de sangsue. Les cellules microgliales ont été testées avec des concentrations croissantes de TGF-β rec. (0 ; 0,5 ; 1 ; 5 et 10 ng/ml).

Les résultats montrent une courbe « en cloche », typiquement observée *in vitro* dans l'utilisation de facteurs chimiotactiques en fonction de leur concentration. Si l'effet chimiotactique croît avec la concentration de la molécule, il atteint un maximum et même décroît ensuite du fait que la molécule très concentrée gagne elle-même le puit contenant les cellules, ce qui inhibe leur déplacement. De ce fait, un effet chimiotactique dépendant de la dose de TGF-β humain recombinant a été démontré (Figure 23B). Environ 24% des cellules microgliales réagissent à la concentration optimale de cette cytokine (1 ng/ml), ce qui montre que la microglie ALK4/5⁺ représente une sous-population de la microglie totale collectée. Dans la chaîne nerveuse, au cours de leur recrutement à la lésion, il n'est pas encore établi que les cellules microgliales réagissent dans les mêmes proportions à un signal chimiotactique dont on ne connaît pas encore la cinétique de production. Dans tous les cas, puisque les cellules microgliales ALK4/5⁺ sont attirées, cela suggère la présence d'un ligand spécifique et naturel chez *H. medicinalis*, libéré au point de la lésion.

1.5. Caractérisation du nGDF, ligand du récepteur ALK4/5

Pour répondre à cette question, nous avons d'abord recherché des membres de la famille TGF-β dans les bases de données de sangsue. En raison de la nature du

récepteur caractérisé et de la réactivité des cellules microgliales à une forme recombinante du TGF- β 1 humain, nous avons interrogé ces bases de données en soumettant sa séquence en acides aminés afin d'obtenir les molécules candidates présentant les homologies les plus significatives.

L'utilisation de la séquence en acides aminés de TGF- β 1 humain dans un BLAST local a permis la détection d'une séquence en particulier pouvant être le membre de la famille TGF- β recherché. Cette séquence candidate, de la même façon que nous l'avions fait pour celle du récepteur, a été validée par des amplifications RACE-PCR suivies de clonage et séquençage. L'ARNm de la molécule orthologue au TGF- β 1 contient 1749 nucléotides et code pour une séquence protéique de 360 acides aminés avec une masse moléculaire théorique déduite de 41775 Da (Figure 24). Par rapport à tous les membres humains de la famille TGF- β , sa séquence en acides aminés possède quelques domaines structuraux conservés, comprenant un domaine propeptide TGF- β N-terminal, un domaine TGF- β actif C-terminal et un site de coupure RRKR dans la région précurseur (Figure 24). Ces deux domaines sont à nouveau schématisés (Figure 25A). Elle compte aussi neuf résidus de cystéine permettant la formation de ponts disulfures inter-chaînes et intra-chaînes, caractéristiques distinctives de la superfamille du TGF- β pour leur interaction avec leurs récepteurs respectifs (Keah & Hearn, 2005).

La séquence en acides aminés de ce membre de la famille TGF- β chez la sangsue (Numéro d'Accession Genbank MH346328) a été comparée avec les membres reconnus comme ligands naturels pour les récepteurs ALK4/5/7, tels que des TGF- β 1/2/3, des activines, les GDF 1/3/11/15 et la myostatine (aussi appelé GDF8) (Annexe 1). A l'issue de l'interrogation, les résultats ont révélé que le ligand est une molécule homologue aux GDF8/11. Cette molécule a été appelée nGDF (Nervous GDF) et présente une identité de 32% et une homologie de 53% avec le précurseur de GDF8 humain et une identité de 34% et une homologie de 49% avec le précurseur humain de GDF11.

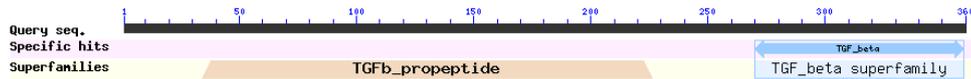
1 gtgaattctcccgttggtggttcaaattccagcgtcaataaatggggcataaaaaccacaa
62 cgggagaattcaccgcaacttctgaataaggatttgatgaagcataattagaatcgagtt
122 agcagcataatgtatatacagagtcacatctctcgtcactctcaccgccacctgtgca
M Y I R V I I F V I I F T A T S A 17
182 acctggaggaggtcttcaggtccatccacttccagcaacaactcgcagtcgtgtcctgct
T W R R S S G P S T S S N N S Q S C P A 37
242 tgtggttctcggactctcaaacgcagccacagattagaagcatcaagaacgaaattcta
C G S R T L K R S H R L E S I K N E I L 57
302 cgaacttccgatgacttaccaccaaagtgcacggcatcagaatgcccaacctgccc
R K L R M T S P P N V T G I R M P N L P 77
362 catctcagatgatcataaacagggttcagatggaaactcaacatgcagcagatcagagc
H L Q M I I N R V Q M E T Q H A A D Q S 97
422 gaaaaatgaactcgcgagcactatgaccatttttgcagtcagtcagagttcaccttatgat
E N E L A T T M T I F R V S Q S S P Y D 117
482 ccgaaagtgcagctgtttatcttgaccttaattcaaacgaactcagatatacacaacaa
P E S S T V Y F D L N S N E L R Y P N Q 137
542 gttgtgaatgctatctttacatctacattcgcacaaactcagcagatcccaaccagactgg
V V N A I F Y I Y I R K L S D P N P D W 157
602 cagagctacgtgctggtttacagaggttacacacagcactcaggacaattattatttgc
Q S Y V L V Y R G Y T Q H S G Q L L F R 177
662 aataaaatcacgtacgagcaaacgggtcagtgatgtttttcaacataacgtctatogtc
N K I T Y E Q T G Q W M F F N I T S I V 197
722 caggactggattcgacacaacgagaccaatagaggcctcgaaatcttctgtatcgataat
Q D W I R H N E T N R G L E I F C I D N 217
782 tcaggacaatccttggtcttactcagaccattaaatgaggaagaagcgagcaataaaatcc
S G Q S L A L T R P L N E E E A S N K S 237
842 tactgcacatggcattgtggaatcaacagcagcagctagaaagagaaatgtggactac
Y L H M D I V E I N S R R R K R N V D Y 257
902 gggagaatcgcgaggaatagttccgagcttgactgctgcaggtatccctggaagtt
G K N C E E Y S S E L D C C R Y P L E V 277
962 aattttcaagaatttggtgggattggatcatcattccaaagacatactcagcgtattac
N F Q E F G W D W I I I P K T Y S A Y Y 297
1022 tgttcaggcgattgcccctctgccttcaagggatccaagccatatacccatgtgactcag
C S G D C P L P S R D P S P Y T H V T Q 317
1082 gataaaatcaaaaggcatgtgctgtgcccccaaatccactcatccatataccatgctttat
D K Y K G M C C A P K S T S S I S M L Y 337
1142 tacgatgagaggatgaacatcgtgtacggggaatacctggatgacagtcacaactgc
Y D E R M N I V Y G R I P G M T V N N C 357
1202 agttgcttctaaactccgcatcttctctcatattcggatatttgagaatacatgaata
S C F 360
1262 atgaagtcagcttttttagatgaaacttttttaataccaagtctcagttttttacacaa
1322 aataactccacaaaataacaagttgaaagttcaaaaattatcttaccacaaatcccttt
1382 tgtcgccaaatcctctttttgtcaccacaaatcctcttttatctccaaacctcttttatcac
1442 cgaatcctctttttccttgcaacagatagccaagggaggtgttctctcactgaactcag
1502 aatgaagaaatggttcttctgaatcttcttaagggtaaacagcctcgagactggagg
1562 tttgttggttggtgcttgaagaacgaatcgtactctcttctgcttgagtccatccttgag
1622 atgacgggagtgatgaagaagcagacaccagctgagaaggatgtatttgggggctat
1682 ccatcgcagatctgttcggtggccgattggaccgactgctgtgatgctattctgagcgt
1742 cccgctcat

Figure 24: Caractérisation moléculaire du nGDF (membre de la famille TGF- β) dans la sangsue. Séquences nucléotidiques et protéomique en acides aminés de nGDF chez la sangsue. Les nombres de nucléotides sont indiqués à gauche et les acides aminés à droite. La séquence protéique du nGDF présente un propeptide et une région de forme mature, tous deux encadrés séparément. La séquence de la protéine nGDF contient le site de coupe RRKR (gris foncé) et neuf résidus de cystéine conservés (gris clair).

De plus, lorsque seule la région peptidique active est comparée, les résultats montrent encore plus d'homologie à ces deux molécules, révélant une homologie de 60% avec le GDF8 et 62% d'homologie avec le GDF11 (Figure 25B). Il est intéressant de noter que,

toutes espèces confondues, les molécules GDF8 et 11 identifiées chez les vertébrés sont les premières dans la hiérarchie des résultats d'alignement à présenter des homologies avec la protéine de sangsue. Enfin si la comparaison est seulement faite avec les formes humaines de ces membres de la famille TGF- β , GDF 8 et 11 sont encore significativement plus homologues que les autres membres.

A MH346328



B

| | 1 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 014793 | | | | | | | | | | |
| 095390 | | | | | | | | | | |
| MH346328 | | | | | | | | | | |
| Consensus | | | | | | | | | | |
| | 91 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
| 014793 | | | | | | | | | | |
| 095390 | | | | | | | | | | |
| MH346328 | | | | | | | | | | |
| Consensus | | | | | | | | | | |
| | 181 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 |
| 014793 | | | | | | | | | | |
| 095390 | | | | | | | | | | |
| MH346328 | | | | | | | | | | |
| Consensus | | | | | | | | | | |
| | 271 | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 |
| 014793 | | | | | | | | | | |
| 095390 | | | | | | | | | | |
| MH346328 | | | | | | | | | | |
| Consensus | | | | | | | | | | |
| | 361 | 370 | 380 | 390 | 400 | 411 | | | | |
| 014793 | | | | | | | | | | |
| 095390 | | | | | | | | | | |
| MH346328 | | | | | | | | | | |
| Consensus | | | | | | | | | | |

Figure 25: Séquence protéique du nGDF et alignement de la séquence de sangsue comparé avec GDF8 et GDF11. (A) Séquence protéique montrant les motifs conservés de la famille TGF- β dans la molécule de sangsue (Numéro d'Accession Genbank MH346328). (B) Alignement de la séquence de sangsue (MH346328) avec les formes humaines de GDF8 (O14793) et GDF11 (O95390). Les homologies hautes et basses sont représentées par des résidus rouges et bleus, respectivement.

Même si à ce stade de l'étude, faute d'éléments fonctionnels précis, il n'y a pas de raison objective à donner à cette molécule le nom de GDF8 ou GDF11, nous avons tout de même souhaité lui donner le nom de nGDF pour sa proximité avec les GDF connus et sa localisation dans le système nerveux. En effet, cette homologie est cohérente avec l'identification du récepteur apparenté à ALK4/5, car ces molécules GDF8 et GDF11 ont été décrites comme utilisant principalement les récepteurs de type II (Activin Receptor kinase type II-A et II-B) et les récepteurs de type I, ALK4 ou ALK5, pour déclencher la transduction du signal via les protéines SMAD 2 et 3 (Walker et al.,

2016). D'ailleurs, les facteurs GDF11 et GDF8 (ou myostatine) sont des membres étroitement liés de la superfamille du TGF- β et sont souvent perçus comme similaires.

2. Fonctions du nGDF dans la réponse à la lésion axonale

2.1. *Le nGDF neuronal est pleinement impliqué dans le recrutement de la microglie à la lésion*

Pour d'abord étudier la localisation de la protéine nGDF, un anticorps polyclonal spécifiquement dirigé contre la partie active C-terminale du TGF- β 1 humain a été sélectionné en raison de la grande homologie de cette région (Figure 26B). Afin de valider l'utilisation de cet anticorps pour les études ultérieures, des expériences de Western blot ont été réalisées à partir d'extraits protéiques de SNC et ont montré la détection d'une protéine majoritaire correspondant à la taille attendue (~41 kDa) pour le ligand nGDF (Figure 26A).

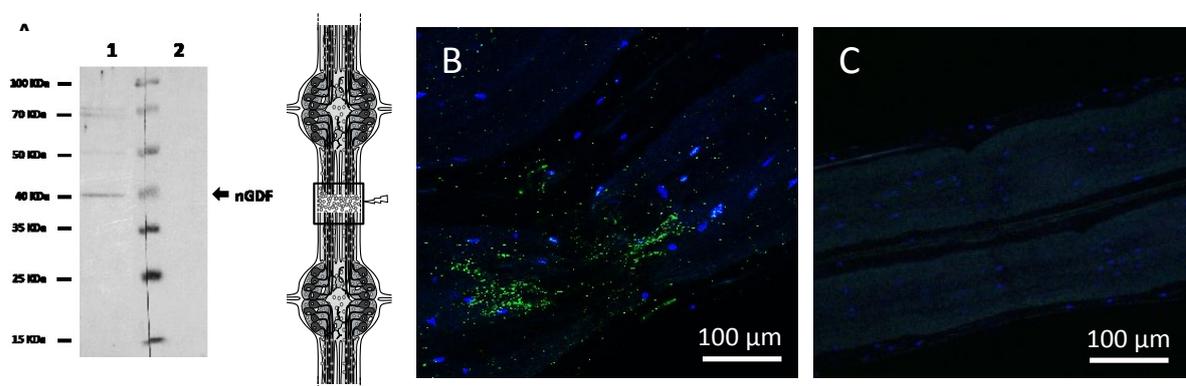


Figure 26 : Immunodétection du nGDF par western blot et par marquage fluorescence dans des fragments de SNC.
A. Immunodétection du nGDF utilisant des anticorps polyclonaux anti-TGF- β actif humain. (A) Immunodétection par Western blot à partir d'extraits protéiques du SNC montrant un signal principal à 41 kDa (piste 1) par rapport à l'immunoblot utilisant l'anticorps secondaire seul (piste 2) en tant que contrôle négatif. (B) Immunodétection par marquage fluorescent et sous microscopie confocale révélant un unique signal au point de lésion 15 minutes seulement après la lésion. Les images sont des agrandissements de la zone de lésion comme indiqué sur le schéma du fragment de chaîne nerveuse (à gauche). (C) Aucun signal n'a été détecté dans les tissus traités avec un anticorps secondaire seul comme contrôle négatif. Les noyaux cellulaires ont été révélés avec un marqueur nucléaire Hoechst 33342 (bleu).

Ce même anticorps a donc été utilisé dans des expériences d'immunofluorescence sur la chaîne nerveuse après lésion. De façon intéressante, l'analyse de la zone de lésion dans les connectifs a montré, seulement 15 minutes après la lésion expérimentale, la

libération significative de nGDF avant même l'arrivée des cellules microgliales sur le site de blessure (Figure 26B).

L'analyse fine des images obtenues dans tous les plans focaux montre très nettement que l'accumulation rapide de nGDF se déroule au contact des axones lésés, ce qui suggère fortement que le nGDF soit libéré par les axones aussitôt après leur lésion alors que les cellules microgliales n'y sont pas encore accumulées. Aucun signal n'a été observé en utilisant uniquement l'anticorps secondaire comme contrôle négatif (Figure 26C). Ce résultat suggère ainsi que le nGDF libéré à la lésion soit d'origine neuronale. Comme cela été décrit précédemment, l'écrasement des connectifs implique la libération à partir des axones de plusieurs facteurs chimiotactiques selon différentes cinétiques afin de déclencher l'accumulation de microglie (Le Marrec-Croq et al., 2013). Les expériences suivantes ont donc voulu vérifier que l'ARNm *ngdf* puisse être induit en réponse à la lésion dans les neurones lésés. Pour cela, les neurones de chaînes nerveuses, fraîchement prélevées et lésées, ont été dissociés et soit congelés (T0) soit remis en culture primaire pendant 24h (T24h). A partir de leurs ARN totaux (T0 vs. T24h post-lésion), les résultats ont montré après normalisation que la blessure augmente de manière significative le niveau de transcrit *ngdf* dans les neurones après 24h (Figure 27).

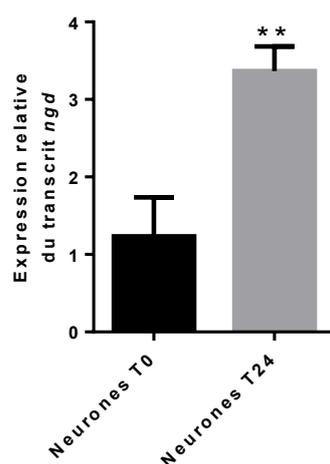


Figure 27 : Résultats de RT-qPCR montrant le niveau relatif de transcrit *ngdf* dans les neurones. Les neurones ont été collectés soit 15 minutes (noir) soit 24h (gris) après la lésion du SNC. Les niveaux sont normalisés par le niveau d'ARNr 18S. La significativité (** $p < 0,01$ vs T0) a été calculée par le test T apparié (la barre représente les erreurs types de la moyenne).

Ce résultat montre que les neurones lésés induisent au cours du temps le transcrit *ngdf* et corrobore l'observation faite précédemment d'une libération axonale de la protéine nGDF. Il est maintenant nécessaire de vérifier si ce membre de la famille TGF- β est capable d'attirer les cellules microgliales sur le site de blessure. Pour cela, des expériences de chimiotactisme *in vitro* ont été effectuées sur des cellules microgliales de sangsue en utilisant du milieu conditionné par des neurones maintenus en culture. Ce milieu conditionné neuronal a été comparé au milieu conditionné par la microglie. Des cultures primaires distinctes de neurones et de cellules microgliales permettent donc de produire des milieux conditionnés respectifs après seulement 15 minutes d'incubation. A l'aide des tests *in vitro* selon la technique de Kohidaï, ces milieux conditionnés contenant leur sécrétome respectif ont été évalués pour leurs propriétés chimiotactiques vis-à-vis de cellules microgliales fraîchement isolées (Figure 28).

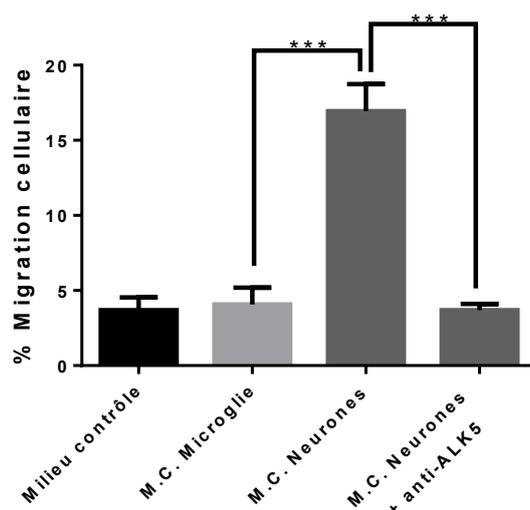


Figure 28: Effet chimiotactique du milieu conditionné de neurones ou de cellules microgliales, sur des cellules microgliales. Le milieu conditionné (M.C.) provenant de la culture primaire de microglies (gris clair) ou de neurones (gris foncé). L'effet chimiotactique du M.C. neuronal a également été évalué sur des cellules microgliales cibles incubées avec un anti-ALK5 pour neutraliser spécifiquement le récepteur ALK4/5 (gris foncé). Un milieu de culture naïf a été utilisé comme contrôle négatif (noir). Un milieu de culture naïf a été utilisé comme contrôle négatif (noir). La significativité (***) $p < 0,001$ a été calculée par le test de comparaisons multiples de ANOVA (la barre représente les erreurs standard de la moyenne).

Les résultats ont montré que le milieu conditionné provenant de neurones présente une fonction chimiotactique significativement plus importante par rapport au milieu conditionné issu de cellules microgliales ou de milieu naïf servant de contrôle. Fait intéressant, lorsque les cellules microgliales cibles sont incubées avec des anticorps

anti-ALK5 permettant de neutraliser spécifiquement le récepteur ALK4/5, leur recrutement est là aussi diminué de manière significative, confirmant ainsi que non seulement la molécule nGDF est libérée très rapidement par les neurones mais aussi qu'elle exerce une fonction chimiotactique importante sur les cellules microgliales dans les premières minutes suivant la lésion. Ce résultat montre aussi que l'attraction de cellules microgliales médiée par le nGDF neuronal passe par la reconnaissance du récepteur ALK4/5 à la surface de cellules microgliales.

A ce stade, il est possible de dire qu'il existe bien un dialogue entre les neurones et les cellules microgliales dépendamment du récepteur ALK4/5 qui utilise comme ligand la molécule nGDF libérée par les axones lésés dans les premières minutes après la lésion pour recruter des cellules microgliales ALK4/5⁺ au site de lésion.

2.2. Les cellules microgliales ALK4/5⁺ contribuent à la phase précoce du recrutement

D'après les résultats précédents, il est donc nécessaire d'évaluer l'importance du recrutement microglial dépendant de la signalisation ALK4/5 de façon cinétique après la lésion axonale. Pour cela, des observations sont à nouveau effectuées *ex vivo* sur des fragments de chaîne nerveuse afin de suivre l'accumulation microgliale à la lésion dans des conditions expérimentales particulières. En effet, grâce à la structure du SNC de la sangsue, outre la facilité d'accès aux tissus afin de collecter la microglie et les neurones, il est également possible de suivre le mouvement de la microglie dans les connectifs après lésion car ces cellules sont les seules capables de migrer vers la lésion. Ainsi, les cellules microgliales peuvent être étudiées *ex vivo* au cours du temps suivant la lésion en utilisant un marqueur nucléaire (Hoechst). De plus, l'accès aisé à la zone de lésion permet de réaliser à l'aide de capillaires très fins des perfusions à l'intérieur de la chaîne lésée de l'anticorps anti-ALK5, pour observer l'effet de sa neutralisation sur le recrutement de cellules microgliales ALK4/5⁺ (Figure 29). Les cellules microgliales ont été étudiées *ex vivo* au cours de leur accumulation. Les cellules microgliales n'ont pas été suivies par un marquage Iba1 afin d'éviter toute détection d'anticorps perfusés. Par conséquent, l'observation des noyaux bleus montrant l'accumulation de la microglie

au niveau de la lésion a été effectuée en triplicat pour chaque condition et comparée après la lésion selon trois temps et sous l'influence de la voie ALK4/5.

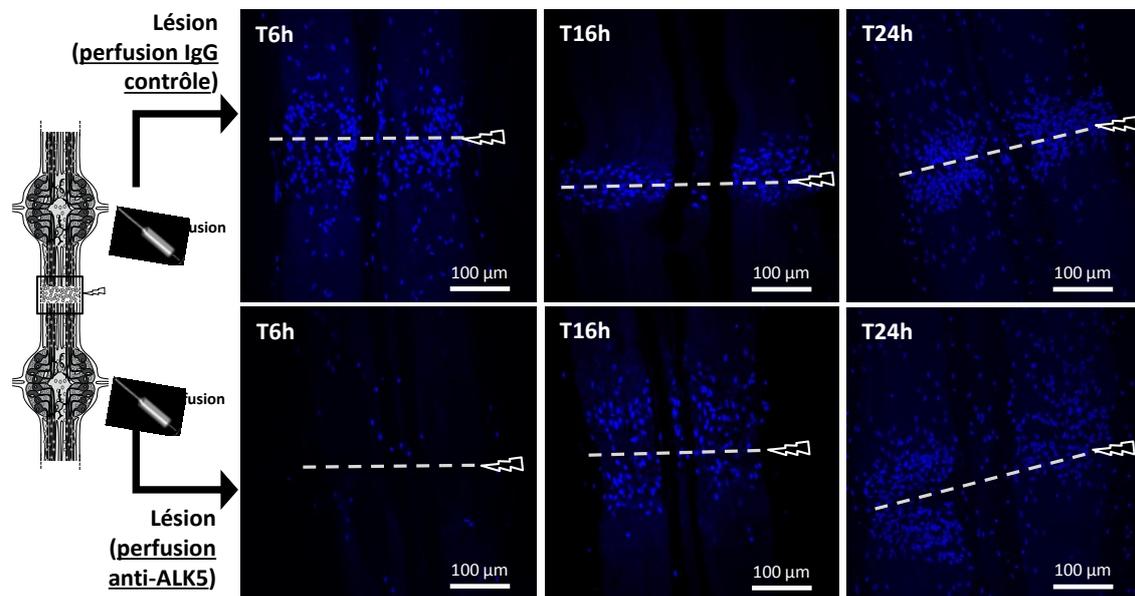


Figure 29 : Expériences ex vivo de recrutement de la microglie au cours du temps et dépendamment d'ALK4/5. Le schéma de gauche précise le dispositif de perfusion réalisé sur les fragments analysés ensuite par microscopie confocale au niveau des connectifs lésés 6h, 16h et 24h après la lésion (images agrandies de la zone de lésion). Le recrutement de la microglie a été suivi par l'utilisation d'un marqueur nucléaire fluorescent Hoechst 33342 (bleu). Les perfusions ont utilisé soit l'anticorps polyclonal de lapin anti-ALK5 humain soit l'IgG contrôle issu de lapin non immunisé.

Les résultats montrent que la neutralisation spécifique d'ALK4/5, comparée à l'accumulation observée avec la perfusion d'IgG contrôle, affecte de manière importante le recrutement de la microglie dans les 6 heures suivant la lésion. En revanche, 16h après la lésion, la neutralisation d'ALK4/5 n'inhibe plus totalement le mouvement microglial à la lésion par rapport au contrôle, ce qui suggère que d'autres signaux chimiotactiques sont naturellement impliqués à ce moment-là. Enfin, la comparaison des deux perfusions 24h après la lésion ne montre plus aucune différence significative, bien que l'anti-ALK5 soit toujours perfusé à long terme en quantité équivalente, ce qui signifie que la voie ALK4/5 n'est plus utilisée pour recruter les cellules microgliales.

Il est donc possible de conclure que cette voie participe à la phase précoce du recrutement de la microglie au niveau de la lésion et que les phases plus tardives de ce recrutement semblent moins utiliser cette molécule (entre 6h et 16h post-lésion) pour

ne plus l'utiliser entre 16h et 24h post-lésion. Ce résultat suggère que d'autres signaux chimiotactiques, médiés par d'autres récepteurs, pourraient conduire et maintenir l'accumulation microgliale dans sa phase ultérieure. De plus, ces résultats apportent un éclairage intéressant sur le dialogue dépendant du nGDF entre microglie et neurones.

A ce stade, il est important de mieux comprendre le niveau d'importance de cette voie de signalisation ALK4/5 dans la réponse à la lésion. Le fait qu'elle soit impliquée dès les premières minutes après la lésion dans le recrutement microglial puis de moins en moins au cours du temps nous amène à nous interroger si cette séquence d'évènements permet d'organiser les autres signaux chimiotactiques, considérant ainsi la signalisation ALK4/5 comme un signal précurseur. En effet, dans les cerveaux embryonnaire et postnatal chez les mammifères, la production de TGF- β au moins par les astrocytes stimule des neurones réactifs qui produiront les facteurs du complément C1q et C3, indispensables au recrutement de cellules microgliales qui élimineront les neurites aberrants et rendront les neurones définitivement fonctionnels (Bialas & Stevens, 2013; Stevens et al., 2007). Cette coopération implique d'une part que les neurones puissent être réactifs en exposant des récepteurs de type ALK5 et suggère d'autre part que les gènes codant les facteurs du complément soient des gènes cibles activés par cette voie ALK5. Or, dans le système nerveux de la sangsue, les résultats précédents ont montré que les neurones sont capables de produire le transcrit *alk4/5* après lésion (Figures 18 et 21) et que les axones sont capables de renfermer le récepteur lui-même (Figure 22). Des études antérieures ont également montré que *HmC1q* est un facteur chimiotactique produit et libéré par les neurones pour recruter la microglie sur le site de lésion (Le Marrec-Croq et al., 2014; Tahtouh et al., 2009, 2012). La molécule C1q serait-elle comme dans le cerveau de mammifères en développement sous l'influence de la signalisation TGF- β ? Cette communication ALK4/5 dépendante est-elle donc bilatérale chez la sangsue en permettant aussi que les neurones soient sous son influence ?

2.3. Les neurones ALK4/5⁺ interviennent dans la phase tardive du recrutement de la microglie

Le marquage axonal immunopositif pour ALK4/5 a pu être confirmé par une analyse ultérieure en immunofluorescence dans laquelle il est possible d'observer ALK4/5 dans les connectifs 16 heures après la lésion. Plus précisément ce marquage se trouve dans certains axones, dont la position apparaît symétrique des deux côtés de la lésion (Figure 30A et B). En parallèle, dans ces conditions 16 heures après lésion, le marquage immunopositif pour ALK4/5 n'est plus du tout détecté dans les cellules microgliales accumulées à la lésion, ce qui confirme de nouveau que le recrutement de cellules microgliales ALK4/5⁺ ne se produit que dans les premières heures suivant la lésion par la libération de nGDF neuronal.

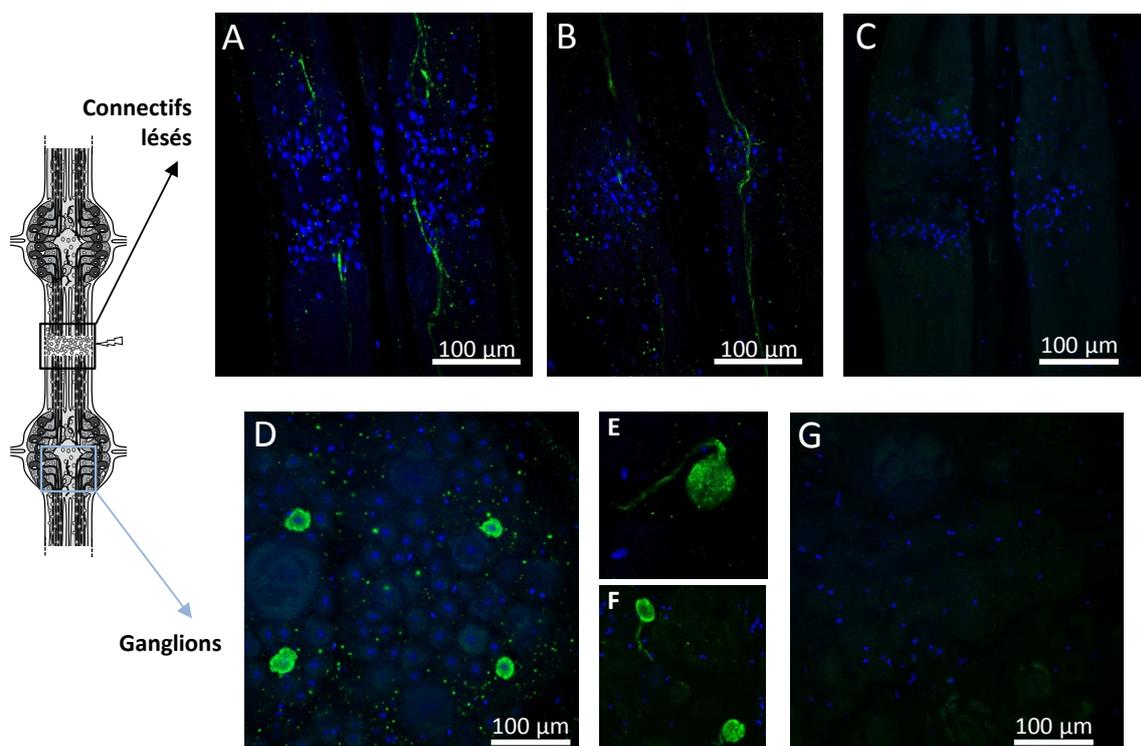


Figure 30 : Analyse en microscopie confocale de l'immunofluorescence ALK4/5 dans des fragments de SNC. Les expériences ont été réalisées sur le SNC 16h après lésion au milieu des connectifs (voir schéma) en utilisant les anticorps polyclonaux de lapin anti-ALK5 humain. (A-B) Les axones lésés sont immunopositifs dans les connectifs 16h après la lésion. (D-F) Certains corps cellulaires neuronaux symétriques (D) sont immunopositifs dans les ganglions montrant l'extrémité proximale des axones (E-F). (C-G) Aucun signal n'a été détecté dans les tissus traités avec un anticorps secondaire seul comme contrôle négatif. Les noyaux sont révélés par un marqueur fluorescent Hoechst 33342 (bleu).

Les mêmes expériences d'immunofluorescence mettent également en évidence quelque corps cellulaires neuronaux ALK4/5⁺ dans les ganglions, 16 et 24 heures après la lésion (Figure 30D). Ces quatre neurones sont remarquablement symétriques dans l'organisation des ganglions et ils sont bien conservés dans les ganglions adjacents. De plus, la superposition de plusieurs plans focaux dans le ganglion nous a permis de suivre ce marquage ALK4/5 vers l'axone (figures 30E et F). Cette observation suggère que les axones ALK4/5⁺ observés à proximité de la lésion dans les connectifs (Figure 30A et B), puissent correspondre à ces corps cellulaires neuronaux ALK4/5⁺ observés dans les ganglions. Aucun signal n'a été observé en utilisant uniquement l'anticorps secondaire comme contrôle négatif (Figure 30C et E).

Ces résultats montrent qu'il existe bien une petite population de neurones positifs pour le récepteur ALK4/5 suggérant qu'ils soient à leur tour réactifs à un ligand de type nGDF. Si oui, il resterait à préciser son origine et surtout à comprendre les raisons d'une telle activation. Par ailleurs, il n'est aucunement question ici d'établir un parallèle entre les neurones libérant nGDF pour recruter précocement une sous-population microgliale et des neurones ALK4/5⁺ probablement réactifs.

Pour en comprendre plus sur les raisons de cette réactivité des neurones ALK4/5⁺ au ligand de type nGDF, des expériences préliminaires ont été réalisées pour évaluer la possibilité que ce dialogue puisse avoir des rôles neurotrophiques dans les neurones de sangsue. De ce fait, des expériences préliminaires ont été réalisées pour évaluer la capacité neurotrophique du TGF- β recombinant humain dans des cultures primaires de neurones de sangsue. Le résultat préliminaire montre qu'il existe une induction significative de la croissance neuritique avec la forme recombinante du TGF- β humain en comparaison aux neurones traités avec le véhicule de cette molécule (Figure 31).

Même si ces résultats restent à valider avec des expériences complémentaires, ils suggèrent que le TGF- β recombinant humain a un impact sur la croissance neuritique. De ce fait, comme l'unique forme de TGF- β chez la sangsue est nGDF, on peut suggérer que le nGDF pourrait avoir un rôle dans la croissance neuritique.

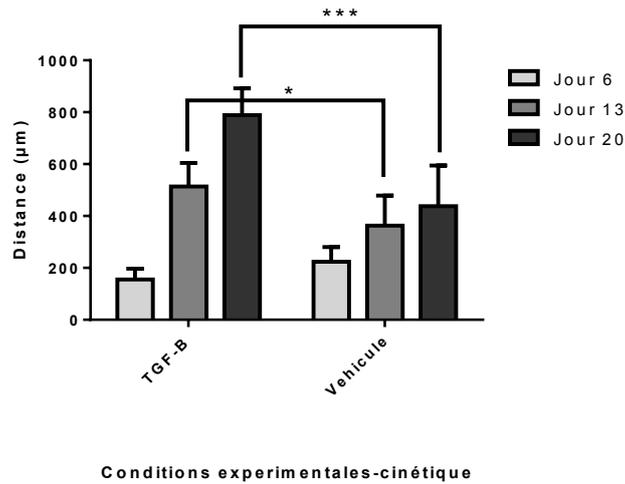


Figure 31: Influence des TGF-β recombinant humain sur la croissance neuritique *in vitro*. Les neurones de sangsue sont cultivés en présence de TGF-β recombinant humain ou du véhicule comme contrôle négatif. Les mesures de longueur neuritique ont été effectuées sur des neurones individuels aux jours 6, 13 et 20 de la culture. Les résultats présentent une croissance significativement plus importante avec le TGF-β recombinant humain aux jours 13 et 20. Les différences statistiques calculées par test ANOVA sont significatives avec * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$. Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne.

Afin d'étudier un possible lien avec le facteur chimiotactique *Hmc1q*, pour les raisons que nous avons évoquées plus haut, nous avons décidé d'étudier cette réactivité neuronale *in vitro*. Les neurones totaux fraîchement prélevés ont été dissociés et exposés à une forme recombinante de TGF-β1 humain (ligand du récepteur ALK5) pendant 24 heures en culture primaire avant qu'ils ne soient analysés et comparés à des neurones cultivés pendant 24 heures sans TGF-β1 humain. Le niveau d'ARNm *hmc1q* a été comparé par RT-qPCR dans les deux conditions (Figure 32). Les résultats montrent que le niveau d'ARNm *hmc1q* est significativement induit dans les neurones activés par le TGF-β recombinant, comparativement à une condition contrôle de neurones sans stimulation. Même si le nombre de neurones ALK4/5⁺ pouvant être réactifs au TGF-β recombinant semble limité dans l'ensemble de la population neuronale totale issue des ganglions (Figure 30D), ils seraient capables de répondre à un signal dépendant d'un membre de la famille TGF-β pour induire *Hmc1q*. Il ne faut pas écarter la possibilité que certains neurones n'exposant pas ALK4/5 aient pu recevoir un signal paracrine les stimulant à produire *Hmc1q*.

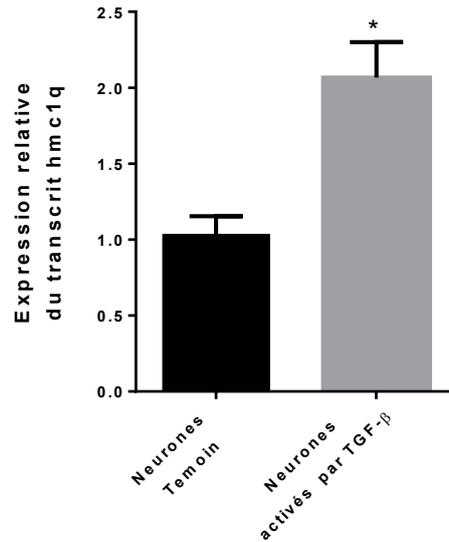


Figure 32 : Etude du niveau relatif de transcrit hmc1q par RT-qPCR dans les cultures primaires des neurones. Les neurones naïfs ont été comparés à des neurones activés par la forme recombinante de TGF-β1 humain. L'ARN ribosomal 18S a été utilisé comme normalisateur. La significativité (* $p < 0,05$ vs neurones naïfs) a été calculée par test T apparié (la barre représente les erreurs standard de la moyenne).

Nous savons que ce facteur chimiotactique est utile pour attirer les cellules microgliales gC1qR⁺ (alias C1qBP) au niveau de la lésion, comme précédemment décrit (Le Marrec-Croq et al., 2014; Tahtouh et al., 2012). En revanche, à ce stade, il n'est pas possible de savoir si des neurones ALK4/5⁺ pourraient contribuer directement ou indirectement à cette libération d'HmC1q à la lésion axonale.

Pour avancer sur cette question, des analyses des mouvements microgliaux gC1qR⁺ (alias C1qBP⁺) à la lésion ont été effectuées *ex vivo* sur des fragments de chaîne nerveuse dans des conditions consistant à neutraliser, dès le départ, le récepteur ALK4/5 avec un inhibiteur spécifique des récepteurs ALK4 et ALK5 (Inman et al., 2002). Les fragments de chaîne nerveuse ont d'abord été incubés en milieu de culture puis lésés expérimentalement au niveau des connectifs. Aussitôt après et pendant les 24 heures suivant la lésion, ils ont reçu une perfusion de cet inhibiteur à l'intérieur des ganglions nerveux. Les mouvements microgliaux gC1qR⁺ ont enfin été analysés par immunofluorescence sous microscopie confocale (Figure 33). Les résultats ont démontré que la perfusion de l'inhibiteur SB431542 neutralisant ALK4/5 dans le SNC lésé réduit le nombre de cellules microgliales gC1qR⁺ accumulées à la lésion 24 heures

post-lésion (Figure 33A) par rapport à un SNC traité uniquement avec le véhicule de l'inhibiteur (Figure 33B).

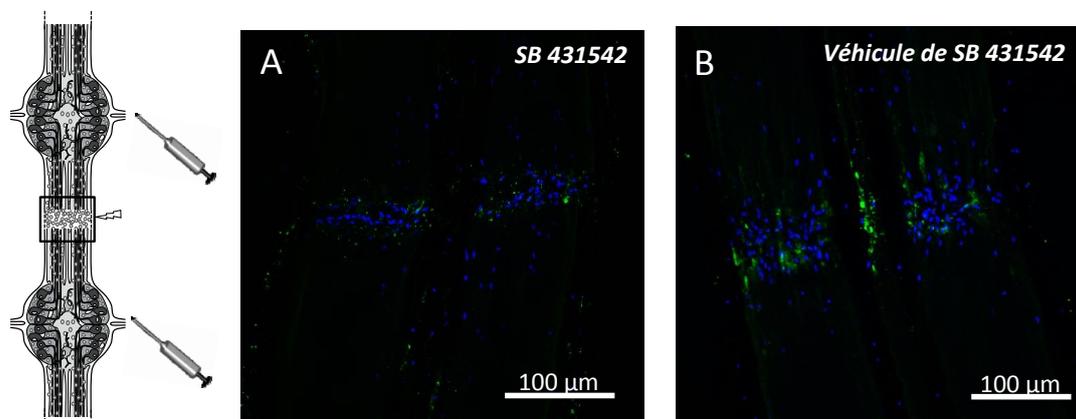


Figure 33: Images en microscopie confocale de l'immunofluorescence $gC1qR^+$ dans des fragments de SNC. Les expériences ont été réalisées en utilisant des anticorps polyclonaux de lapin anti- $gC1qR$ humain dans le SNC 24h après la lésion au milieu des connectifs (voir schéma). Sur des triplicats, les fragments de chaîne injectés avec l'inhibiteur SB431542 (A) ont été comparés avec ceux ayant seulement reçu le véhicule de l'inhibiteur (B) en tant que contrôle négatif de neutralisation. Les noyaux des cellules de la microglie ont été suivis avec Hoechst 33342 (bleu). Les images montrent l'agrandissement de la zone de lésion (voir schéma)

Pris dans leur ensemble, ces résultats démontrent que les neurones $ALK4/5^+$ contribuent à induire une accumulation de cellules microgliales $gC1qR^+$ dans la phase plus tardive du recrutement microglial à la lésion. Ces neurones $ALK4/5^+$ pourraient produire directement $HmC1q$ comme agent chimioattractant et même propager un signal plus vaste dans d'autres neurones contribuant à une libération plus large d' $HmC1q$ dans les axones au niveau de la lésion. Ce dernier mécanisme est à ce stade hypothétique. Ce dont nous pouvons être sûrs, c'est que les neurones $ALK4/5^+$ sont réellement activés par un ligand du récepteur $ALK4/5$ véhiculé dans le système nerveux.

2.4. Les cellules microgliales activent les neurones $ALK4/5^+$ pour la production de $HmC1q$

Des expériences de RT-qPCR ont étudié le niveau de transcrit $hmc1q$ à partir de neurones maintenus en culture primaire, soit cultivés seuls (naïfs) soit en étroite relation avec le milieu de cellules microgliales cultivées dans le compartiment voisin. Les deux compartiments cellulaires sont cultivés de façon à les faire communiquer au

travers d'un insert de culture correspondant à une membrane perméable aux molécules (Transwell®). Puis les neurones ont été prélevés et le niveau de transcrite *hmc1q* neuronal a été évalué. Les résultats ont montré son induction significative dans les neurones co-cultivés avec les cellules microgliales par rapport aux neurones naïfs (Figure 34). De plus, une troisième condition expérimentale a consisté à maintenir la co-culture neurones-microglie en présence de l'inhibiteur spécifique de la voie ALK4/5 (SB431542). Sous cette inhibition de la voie ALK4/5, l'induction du niveau d'ARNm *hmc1q* a été partiellement mais significativement diminuée dans les neurones alors qu'ils sont toujours sous l'activation du milieu de co-culture avec la microglie.

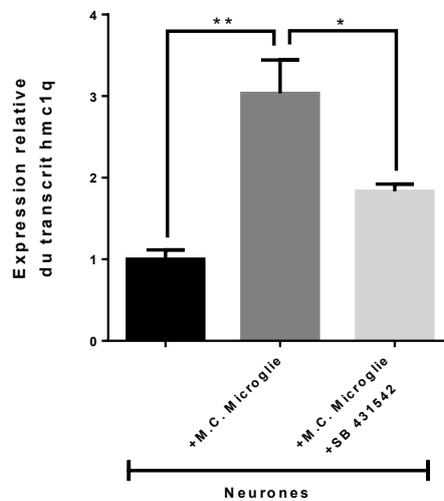


Figure 34 : Analyse par RT-qPCR du niveau d'ARNm *hmc1q* dans les cultures primaires des neurones. Les neurones naïfs (noir) ont été comparés aux neurones activés par le milieu conditionné microglial (M.C., gris foncé) et aux neurones activés par M.C. en présence d'un inhibiteur d'ALK4/5 (SB 431542) (gris clair). L'ARN ribosomal 18S a été utilisé comme normalisateur. Les différences statistiques sont significatives avec * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Cet inhibiteur cible clairement les neurones ALK4/5⁺ car aucune microglie n'a montré de marquage immunopositif pour le récepteur ALK4/5 dans ces temps tardifs post-lésion (Figure 30A et B). De plus, l'inhibiteur a été mis en incubation dans la culture primaire des neurones au préalable, puis ils ont été centrifugés et le milieu a été changé avant de les mettre en co-culture avec les cellules microgliales. De ce fait, seulement une quantité minimale d'inhibiteur a pu rester suite à la centrifugation et le changement de milieu. En tenant compte de l'architecture de la chaîne nerveuse, les corps cellulaires neuronaux sont en étroite relation avec les cellules microgliales ganglionnaires. Ces cellules microgliales n'ont jamais présenté de signal immunopositif

pour ALK4/5, ce qui suggère qu'elles aient avant tout un statut « sédentaire » assurant un rôle de partenaire privilégié avec les corps cellulaires neuronaux voisins. Les résultats démontrent que des cellules microgliales stimulent l'ARNm *hmc1q* neuronal via la voie ALK4/5, suggérant ensuite la production neuronale de HmC1q.

Comme la seule molécule d'intérêt que nous ayons détectée dans les bases de données et étudiée en tant que ligand des récepteurs de type I au TGF- β est le nGDF, notre objectif ici est d'étudier sa production dans les cellules microgliales et son rôle dans l'induction des corps cellulaires neuronaux.

2.5. *Les microglies ganglionnaires activées produisent également nGDF pour influencer les neurones*

Pour mieux comprendre comment les cellules microgliales interviennent dans l'activation neuronale ALK4/5⁺ dans cette phase tardive (24 heures post lésion) de la réponse à la lésion, des extraits protéiques de neurones et de microglie ont été analysés par western blot dans le but de détecter la protéine nGDF (Figure 26A). Les résultats ont montré très nettement, 24 heures après la lésion, que les neurones n'ont visiblement pas encore renouvelé la protéine, que l'on sait très impliquée dans le recrutement précoce de la microglie dans les connectifs, alors que les cellules microgliales sont, elles, immunopositives (Figure 35). Ces résultats qui présentent en effet une bande très intense à environ 41 kDa montrent que les cellules microgliales produisent nGDF dans une étape tardive post-lésion.

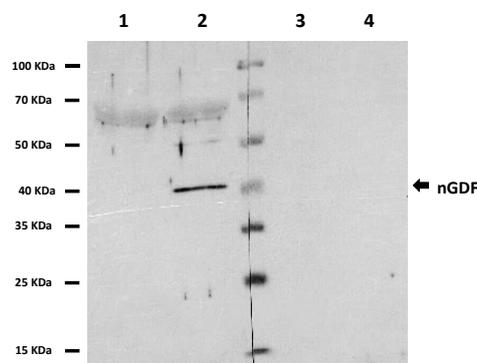


Figure 35: Analyse par Western blot de nGDF sur d'extraits protéiques de neurones et de cellules microgliales. Les extraits protéiques des neurones (pistes 1,3) et de microglie (pistes 2,4) prélevés à partir du SNC lésé (24 heures après la lésion) en utilisant des anticorps polyclonaux de lapin anti-TGF- β humain (pistes 1,2, immunoblot de gauche) et un anticorps secondaire seul comme contrôle négatif (pistes 3,4, immunoblot de droite). Le marqueur de poids moléculaire dont les valeurs sont reportées sur la gauche est visible entre les pistes 2 et 3.

De manière intéressante, des expériences d'hybridation in situ ont corroboré ce résultat en confirmant la localisation spécifique de l'ARNm *ngdf* dans la microglie ganglionnaire qui est en relation étroite avec les corps cellulaires neuronaux (Figure 36A). La sonde sens utilisée comme contrôle négatif n'a donné aucun signal (Figure 36B).

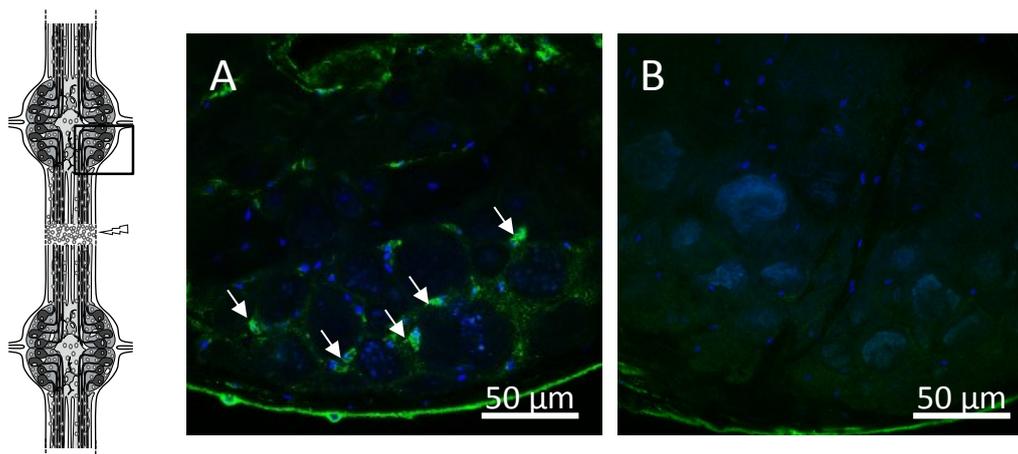


Figure 36 : Analyse par hybridation in situ de l'ARNm *ngdf* dans les ganglions nerveux sur des fragments de SNC. L'HIS a été réalisé sur un fragment SNC 24h après la lésion au milieu des connectifs (voir schéma), en utilisant la ribosonde antisens (A) et la ribosonde sens comme contrôle négatif (B). (A) Les flèches représentent l'emplacement de cellules microgliales positives pour *ngdf* (vert). (B) Aucun signal n'a été détecté dans les tissus dans lequel on a utilisé la ribosonde sens comme contrôle négatif. Les noyaux cellulaires sont révélés par un marqueur fluorescent Hoechst 33342 (bleu).

De la même façon, les analyses d'immunofluorescence dans les ganglions nerveux ont également confirmé la localisation de la protéine nGDF dans des cellules microgliales ganglionnaires, dans des régions similaires à celles observées pour l'ARNm *ngdf* et dans des espaces inter-neuronaux (Figure 37A). Le contrôle négatif ne montre pas ces signaux (Figure 37B). Pris dans leur ensemble, les résultats suggèrent que certaines cellules microgliales ganglionnaires produisent nGDF qu'elles pourraient libérer afin d'interagir avec les corps cellulaires neuronaux dans les ganglions et stimuler la production d'*HmC1q* par les neurones. Ces cellules microgliales résident dans les ganglions, ce qui suggère à nouveau qu'elles soient fonctionnellement orientées vers le dialogue avec les corps cellulaires neuronaux.

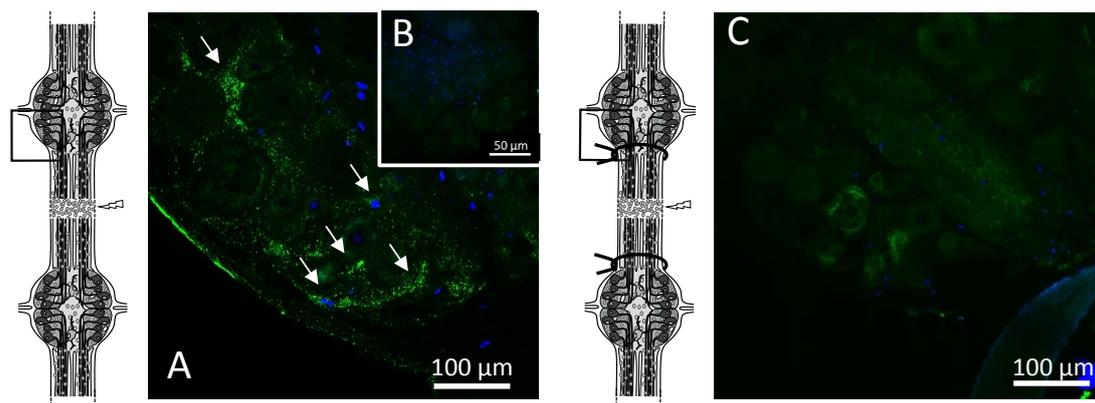


Figure 37: Analyse par microscopie confocale de l'immunofluorescence de nGDF dans les ganglions nerveux sur des fragments de SNC. Les analyses ont été faites dans des ganglions nerveux (voir les encadrés dans les schémas) d'un fragment de chaîne à 24 heures après sa lésion au milieu des connectifs, à l'aide d'anticorps polyclonal de lapin anti-TGF- β humain. (A et B) Les tissus sont libres de toute circulation. Les flèches en A signalent des cellules microgliales immunopositives pour nGDF (vert). (C) Des ligatures disposées entre les connectifs et les ganglions empêchent la circulation des molécules (voir les schémas). (B) Aucun signal n'a été détecté dans les tissus traités uniquement avec un anticorps secondaire en tant que contrôle négatif. Les noyaux cellulaires sont révélés avec le marqueur fluorescent Hoechst 33342 (bleu).

Des analyses d'immunofluorescence complémentaires ont été réalisées dans les ganglions pour essayer de comprendre comment les cellules microgliales ganglionnaires reçoivent un signal d'activation induisant leur production de nGDF. Ces analyses ont révélé que les cellules de la microglie ganglionnaire ne produisent pas de nGDF lorsque le fragment isolé de chaîne nerveuse est ligaturé entre les connectifs et les ganglions (Figure 37C). Cette condition expérimentale supplémentaire interdit toute relation entre les axones lésés dans les connectifs et les cellules des ganglions nerveux. Dans cette condition, les cellules microgliales ganglionnaires ne montrent pas de marquage immunopositif pour nGDF, ce qui suggère que le signal d'activation induisant sa production par les cellules microgliales provient de facteurs libérés dans la zone de lésion et qui informeraient à distance la microglie résidente ganglionnaire. Il n'est pas possible à ce stade de savoir si ce signal provient des axones endommagés et/ou de la microglie recrutée localement, menant *in fine* à un programme neuronal spécifique.

Ces travaux portant sur l'étude des fonctions du nGDF dans la réponse à la lésion démontrent qu'il a un rôle important dans l'étape précoce du recrutement microglial mais aussi dans les séquences plus tardives. Dans l'étape précoce du recrutement, le

nGDF est libéré par les axones lésés pour attirer les cellules microgliales ALK4/5⁺ au point de la lésion dans les connectifs. Dans l'étape tardive, le nGDF probablement libéré par les cellules microgliales ganglionnaires active les neurones ALK4/5⁺ pour induire une production de *HmC1q*. Ce facteur est libéré ensuite par les axones au point de leur lésion pour attirer les cellules microgliales gC1qR⁺ (C1qBP⁺) et ainsi maintenir l'accumulation microgliale. Par conséquent, il existe bien un dialogue bilatéral entre la microglie et les neurones organisé de façon chronologique et dépendant de l'architecture de la chaîne nerveuse.

Nous commençons à préciser certaines étapes chronologiques de la réponse microgliale chez la sangsue. En considérant les autres molécules chimiotactiques, notamment IL-16 et EMAPII, décrites dans le recrutement microglial à la lésion (Croq et al., 2010; Schikorski et al., 2009), il paraît intéressant de savoir si le nGDF peut influencer leur production. Des expériences préliminaires ont été effectuées sur des neurones stimulés avec le TGF- β recombinant humain dans le but de comprendre si l'influence observée avec *HmC1q* existe aussi avec *HmIL-16* et EMAPII. Les résultats montrent que les neurones stimulés présentent un niveau de transcrit *emapII* et *hmil-16* plus élevés par rapport aux neurones témoins (Figure 38).

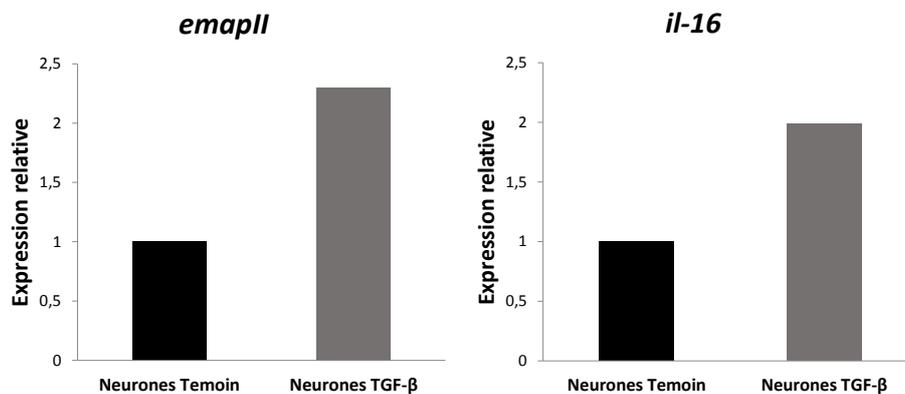


Figure 38 : Analyse préliminaire par RT-qPCR des niveaux d'ARNm d'*emapII* et *hmil-16* dans la culture primaire des neurones. Les neurones ont été activés par TGF- β recombinant humain comparés aux neurones témoins (véhicule du TGF- β). L'ARN ribosomal 18S a été utilisé comme normalisateur.

Même si ces résultats doivent être confirmés, cela pourrait signifier que la production neuronale de ces autres molécules chimiotactiques pourrait dépendre d'une signalisation ALK4/5. Afin de savoir si le recrutement microglial ALK4/5⁺ n'est que le

début d'un programme chronologiquement organisé, la zone de lésion avec ses bouleversement moléculaires a fait l'objet d'une étude plus vaste.

3. Etude de la signature protéomique chez la sangsue:

Comme les résultats présentés jusque-là l'ont démontré, la voie ALK4/5 est pleinement impliquée dans le dialogue entre la microglie et les neurones. La réponse à la lésion axonale dans les connectifs se caractérise notamment par un recrutement progressif de sous-populations microgliales. Ces cellules engageront des fonctions et des interactions avec les extrémités axonales que nous souhaitons comprendre. Grâce aux outils du laboratoire et à sa plateforme protéomique, nous avons été capables d'étudier les signatures protéiques spécifiquement détectées au point de la lésion au cours du temps. L'analyse de cette zone de lésion traduit la réponse des neurones à leur propre lésion mais aussi le déplacement de la microglie. Afin de comprendre le niveau d'importance de la voie ALK4/5, les signatures protéiques naturelles ont été également comparées à celles obtenues dans des conditions de perfusion de l'inhibiteur spécifique de la voie ALK4/5.

3.1. Etude de la signature protéomique aux lésions ALK4/5 dépendant :

Nous avons tout d'abord recherché la méthode la plus adaptée à cette étude. Bénéficiant des innovations technologiques du laboratoire, il a été décidé d'utiliser la technique de micro-extraction liquide de surface (LESA) qui permet d'identifier des biomolécules *in situ* en utilisant une extraction par micro-jonction liquide (Figure 39). Les instruments utilisés sont capables de réaliser l'extraction protéique dans une zone de quelques centaines de micromètres de côté, ce qui convient parfaitement à la zone de lésion des tissus connectifs.

Le principe de cette technique LESA se base sur l'extraction de protéines d'un tissu par un contact avec une goutte de solvant, formant une micro-jonction liquide (Wisztorski et al., 2013). Une fois en contact avec le tissu, la goutte de solvant permet d'extraire les protéines issues de la zone. Les paramètres du dépôt : distance, volume utilisé et

temps d'incubation sont contrôlés à l'aide d'un automate TriVersa Nanomate (Advion BioSciences Inc.). Utilisée couramment sur coupe de tissu, cette technique a fait l'objet de mise au point pour l'adapter à l'analyse d'un fragment d'organe.

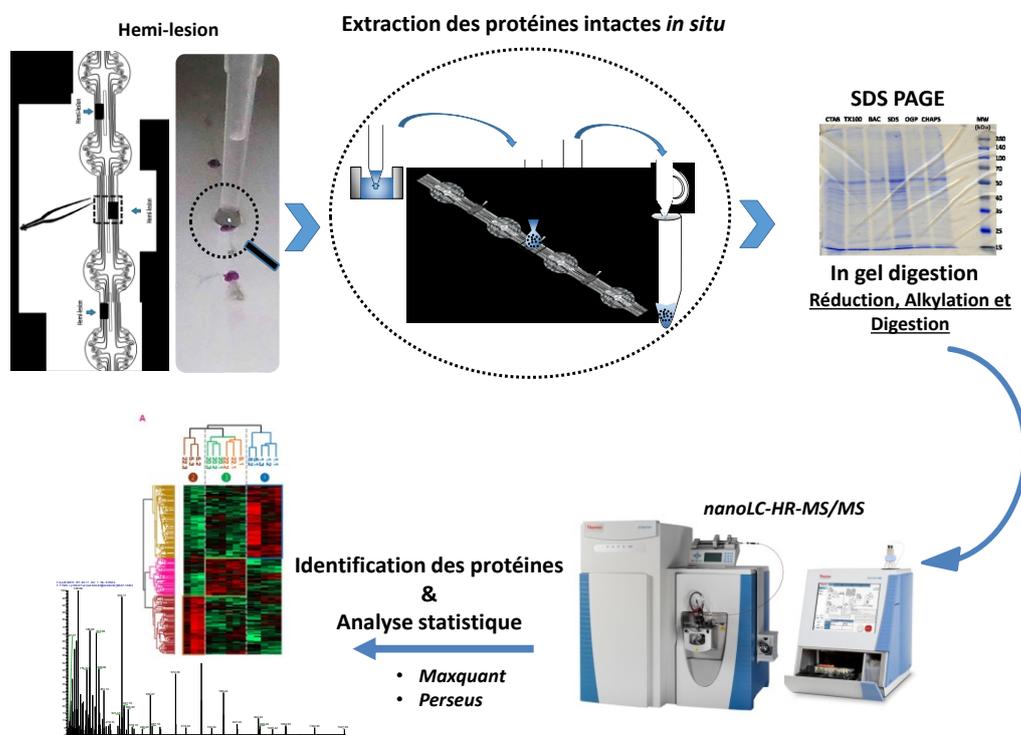


Figure 39 : Protocole expérimental utilisé pour l'analyse protéomique ex vivo de la lésion du SNC de la sangsue. Image représentative de la procédure LESA aux trois points du fragment de la chaîne nerveuse lésée (en violet) suivie d'une analyse nLC-MS/MS. Cette procédure a été réalisée dans le SNC lésé après incubation dans l'inhibiteur SB431542 ou dans le véhicule comme témoin.

Pour notre étude, des fragments de 4 ganglions issus de SNC de sangsue sont prélevés puis lésés *ex vivo* par trois hémi-lésions dans chaque connectif entre chaque paire de ganglions de sorte qu'il y ait 3 points d'extraction par fragment. Le profil protéomique de la lésion a été effectué selon trois temps différents T0, T6 heures et T24 heures post-lésion, avec traitement de l'inhibiteur SB431542 ou de son véhicule.

D'abord, les premiers résultats montrent que quelles-que-soient le temps et/ou les conditions, des signatures de protéines exclusives sont identifiées, comme on peut l'observer dans le diagramme de venn (Figure 40). La liste des protéines a été répertoriée dans le tableau en Annexe 2. Cette analyse montre qu'il y a bien des différences induites au point de la lésion dépendamment du temps post-lésion mais

aussi du traitement. Cela montre également qu'une partie de la réponse à la lésion dépend de la voie de signalisation ALK4/5.

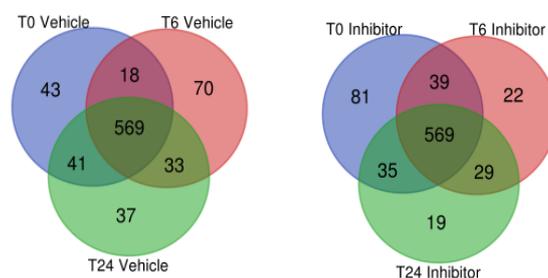


Figure 40 : Diagramme de Venn des signatures de protéines dans SB431542- vs. véhicule, temps par temps. Les diagrammes de venn représentent le nombre de protéines communes et exclusives entre les trois temps post-lésion T0, T6h ou T24h dans chacune des conditions (avec inhibiteur SB431542 ou avec son véhicule).

Ensuite, afin d'obtenir des informations précises sur la signature spécifique du processus moléculaire à la lésion, l'identification des protéines exclusives et communes ne suffit pas. Il est nécessaire d'obtenir une représentation relative des protéines communes entre chaque échantillon. Pour comparer les protéines communes entre chaque échantillon, les spectres de spectrométrie de masse obtenus après analyse nLC-MS/MS ont été traités par le logiciel Maxquant en « label free quantification » (LFQ), permettant d'établir une valeur de quantité relative et d'identifier les protéines présentes dans chaque échantillon. Ces valeurs de LFQ sont ensuite utilisées afin de réaliser des analyses statistiques en utilisant le logiciel Perseus permettant de représenter les variations spécifiques mises en évidence après un test ANOVA grâce à des cartes thermiques également appelées Heatmaps. Ceci nous a permis de mettre en évidence des protéines surreprésentées entre les différents temps T0 vs. T6h vs. T24h en présence de l'inhibiteur SB431542 mais aussi dans les conditions du véhicule. Les résultats ont montré des groupes bien différenciés de signatures protéiques surreprésentées dans des profils dépendamment du temps (T0 vs T6 vs T24), avec ou sans inhibiteur SB431542 (Figure 41A). Ces protéines ont été répertoriées dans l'Annexe 3. Pour avoir une première idée de l'effet de l'inhibiteur spécifique de la voie ALK4/5, les protéines surreprésentées et celles exclusives de l'inhibiteur ont été comparées à celles obtenues dans les clusters des échantillons traités avec le véhicule à T0 post lésion (15 minutes). Cela a permis d'identifier la présence de protéines associées à la voie TGF- β . Les résultats montrent que la

présence de SB431542 induisant une inhibition spécifique de la voie ALK4/5 (Inman et al., 2002), a entraîné une diminution du nombre de protéines associées à la signalisation du TGF- β dans la réponse à la lésion, effet également retrouvé dans la littérature (Figure 41B).

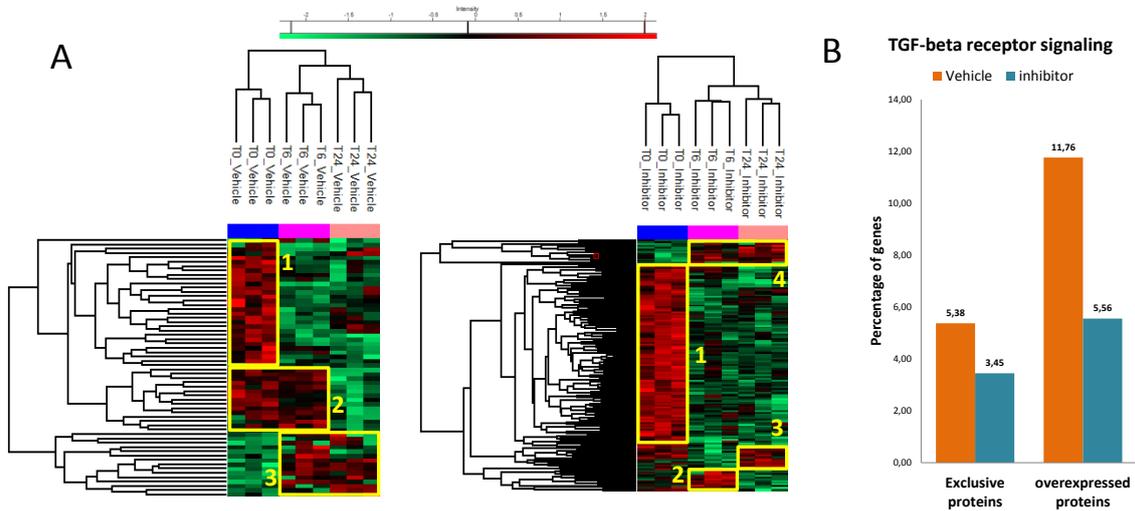


Figure 41: Analyse chronologique des signatures de protéines dans SB431542 vs. véhicule. (A) Les logiciels Maxquant et Perseus ont été utilisés pour générer les Heatmaps. On y observe trois clusters en condition de contrôle (véhicule) et quatre clusters en condition d'inhibiteur (encadrés en jaune). (B) L'analyse des voies biologiques (Gene Ontology, GO) a été réalisée dans le logiciel FunRich et s'est concentrée sur la signalisation du TGF- β . Le graphique montre le pourcentage de protéines identifiées par spectrométrie de masse qui correspond à cette voie par rapport à un nombre total de protéines identifiées.

Afin de mettre en évidence les événements moléculaires les plus pertinents au niveau de la lésion, les signatures protéiques ont été étudiées en comparant les conditions de l'inhibiteur SB431542 et du véhicule pour chaque temps indépendant après la lésion (Figure 42). Les diagrammes de Venn montrent qu'il y a bien des protéines exclusives dans chaque condition à chaque temps (Figure 42A). De manière intéressante, si l'on se concentre sur les protéines exclusives dans la condition SB431542 comparée au véhicule, le nombre de protéines est plus important dans les temps précoces après la lésion, à savoir T0 (79 et 26) et T6h (73 et 104) par rapport à la réponse plus tardive à la lésion, à savoir T24h (7 et 16) (Figure 42A). Le grand nombre de protéines uniques à chaque condition (inhibiteur ou véhicule), à la fois à T0 et à T6h post-lésion, confirme que la voie ALK4/5 représente un processus important au tout début de la réponse à la lésion. A l'inverse, le peu de différences entre les deux conditions à T24h suggère que, malgré une présence constante de l'inhibiteur, la voie ALK4/5 ne semble plus avoir un

effet aussi large à T24h post-lésion. Cette observation est la même pour ce qui concerne les signatures communes. Leur analyse a montré des clusters contenant un nombre plus élevé de protéines surreprésentées à T0 et T6h par rapport à T24h après la lésion (Figure 42B).

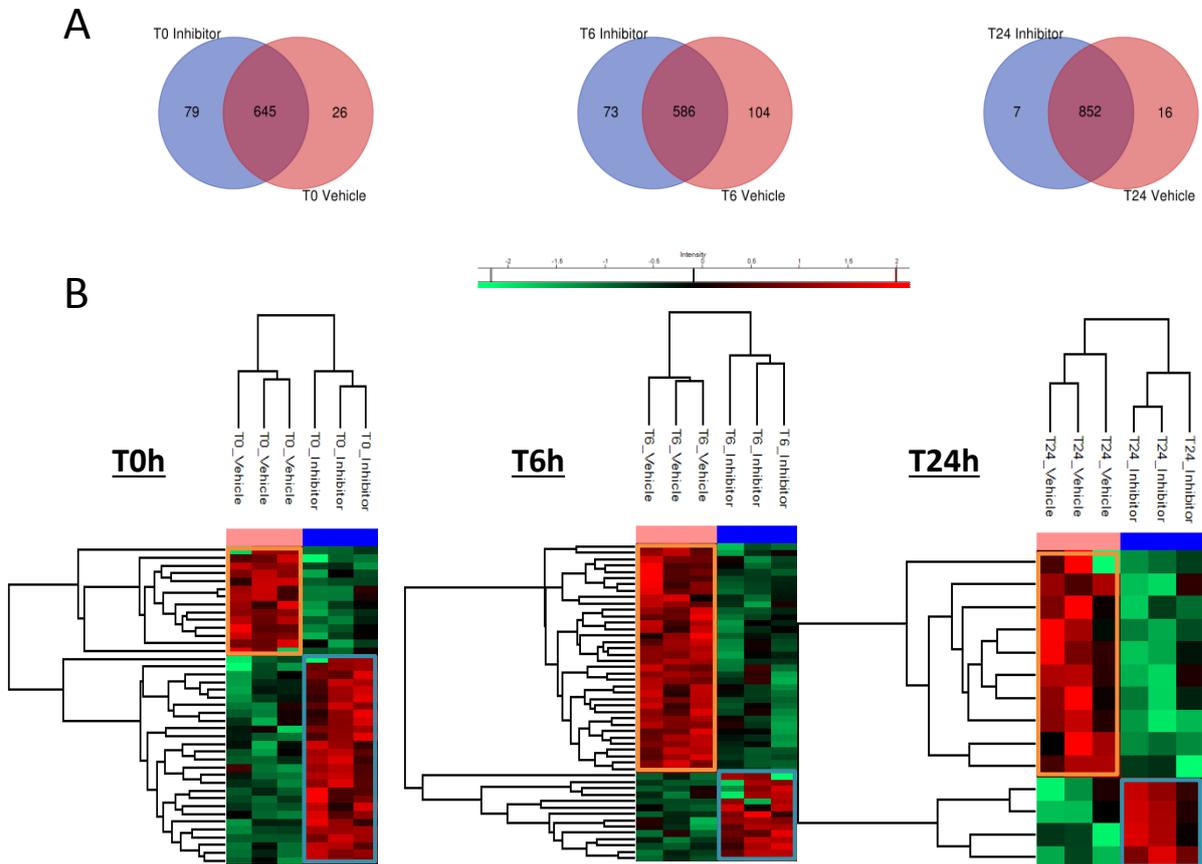


Figure 42 : Analyse des signatures de protéines dans SB431542 vs. véhicule, temps par temps. (A). Diagrammes de Venn des protéines communes et exclusives comparant les conditions de l'inhibiteur SB431542 et du véhicule à T0, T6h ou T24h. (B). Heatmaps des variations significatives de quantité de protéines identifiées par MaxQuant en LFQ à T0h, T6h et T24h. Les clusters montrent le regroupement des protéines surreprésentées (en rouge) dans les échantillons véhicules (encadré orange) et inhibiteurs SB431542 (encadré bleu).

Une première analyse « molécule par molécule » des protéines exclusives (Annexe 4) et des protéines surreprésentées (Annexe 5) qui ont été identifiées dans chaque condition permet la mise en évidence d'évènements moléculaires qui pourraient être étroitement liés à l'inhibition d'ALK4/5 à chaque temps post-lésion. Dès le début de l'inhibition d'ALK4/5, à T0 (15 minutes) post-lésion, certaines protéines exclusives ou surreprésentées sont impliquées dans des processus neurodégénératifs telles que la succinate-CoA ligase (SUCLG1), le complexe NADH déshydrogénase (NDUFA10,

NDUFS2), le cytochrome C (CYCS), l'oxoglutarate déshydrogénase (OGDHL), les sous-unités d'ATP synthase (ATP5J2, ATP5A1) et la phosphoglycérate kinase 2 (PGK2) (Zhang et al., 2017).

Pour obtenir une vision plus large permettant d'interpréter ces signatures protéiques, il est nécessaire de regrouper les jeux de protéines exclusives (Annexe 4) avec les jeux de protéines surreprésentées (Annexe 5) de chaque condition (avec inhibiteur ou véhicule) et pour chaque temps. Cette analyse globale permet alors de comparer les processus fonctionnels impliqués dans la réponse à la lésion. Pour cela, le logiciel Funrich a été utilisé afin d'étudier l'implication de ces protéines dans différentes voies biologiques, pour chaque condition expérimentale (Figure 43).

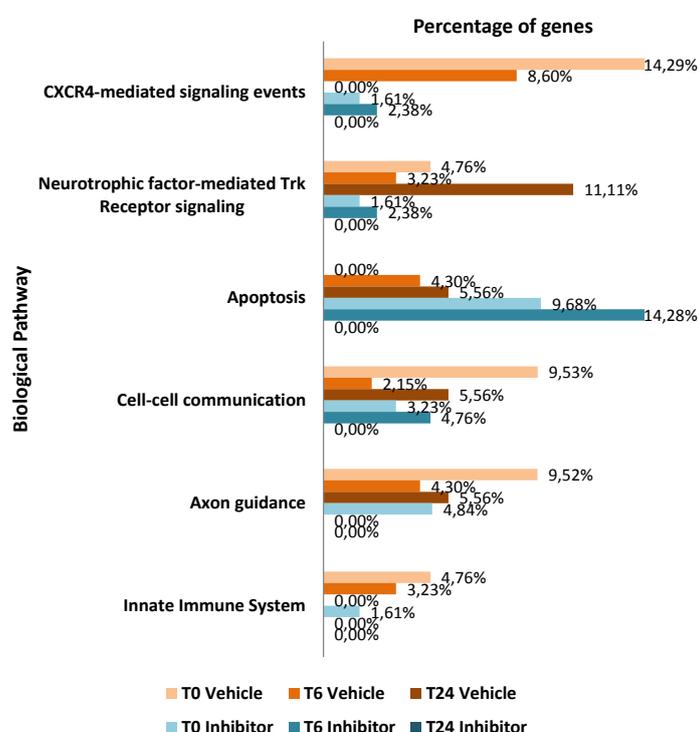


Figure 43 : Analyse par le logiciel Funrich des voies biologiques. Les analyses ont été faites à partir des protéines exclusives (diagramme de Venn) et surexprimées (Heatmaps). Le graphique montre le pourcentage de protéines identifiées par rapport au nombre total de protéines, en comparant les 3 temps du véhicule (nuances oranges) aux 3 temps de l'inhibiteur SB431542 (nuances bleues).

Parmi les nombreuses voies biologiques mises en évidence, il est possible d'observer des différences entre les deux conditions avec ou sans traitement de l'inhibiteur. Les résultats montrent que les voies biologiques impliquées dans les processus fonctionnels de la réparation sont impactés par le traitement à l'inhibiteur. En effet, on

observe une diminution de la quantité de protéines impliquées dans ces voies de signalisation, notamment (i) la voie de signalisation médiée par CXCR4 qui régule la fonction synaptique et la survie neuronale (Khan et al., 2008; Réaux-Le Goazigo, Van Steenwinckel, Rostène, & Mélik Parsadaniantz, 2013), (ii) la voie de signalisation du récepteur Trk médiée par des facteurs neurotrophiques qui conduit la régénération des axones (Cheah & Andrews, 2016) (iii) et d'autres voies plus générales de communication entre cellules, de guidage axonal et d'immunité innée (Figure 43). A l'inverse, le traitement de l'inhibiteur déclenche une augmentation de la représentation des protéines impliquées dans l'apoptose. Dans leur ensemble, les résultats montrent que la voie ALK4/5 a une influence dans plusieurs processus clé conduisant à la régénération de l'axone chez la sangsue. Les protéines associées à chaque voie de signalisation sont détaillées dans les Annexe 4 et 5.

De façon intéressante, en considérant uniquement la condition véhicule, censée reproduire la réponse naturelle à la lésion, la comparaison des trois temps (T0 vs. T6h vs. T24h) a montré l'implication précoce de la voie de signalisation médiée par CXCR4, tandis que la signalisation du récepteur Trk médiée par des facteurs neurotrophiques est un mécanisme plus tardif. Ces résultats soulèvent de nouvelles hypothèses sur le processus de recrutement des sous-populations microgliales qui est mis en place en fonction du temps et qui participe à ces mécanismes.

De plus, les résultats ont montré une forte représentation des composants cellulaires associés aux exosomes au point de la lésion (Figure 44A, Annexe 6). La présence importante de protéines associées à ces vésicules extracellulaires suggère leur rôle dans la réponse à la lésion. Nous explorerons ultérieurement cette part importante de la réponse à la lésion. En effet, comme cela a été représenté à l'aide du logiciel STRING, ces protéines de nature exosomale représentent jusqu'à 59% des signatures protéiques détectées dans le véhicule T6h post-lésion (Figure 44B).

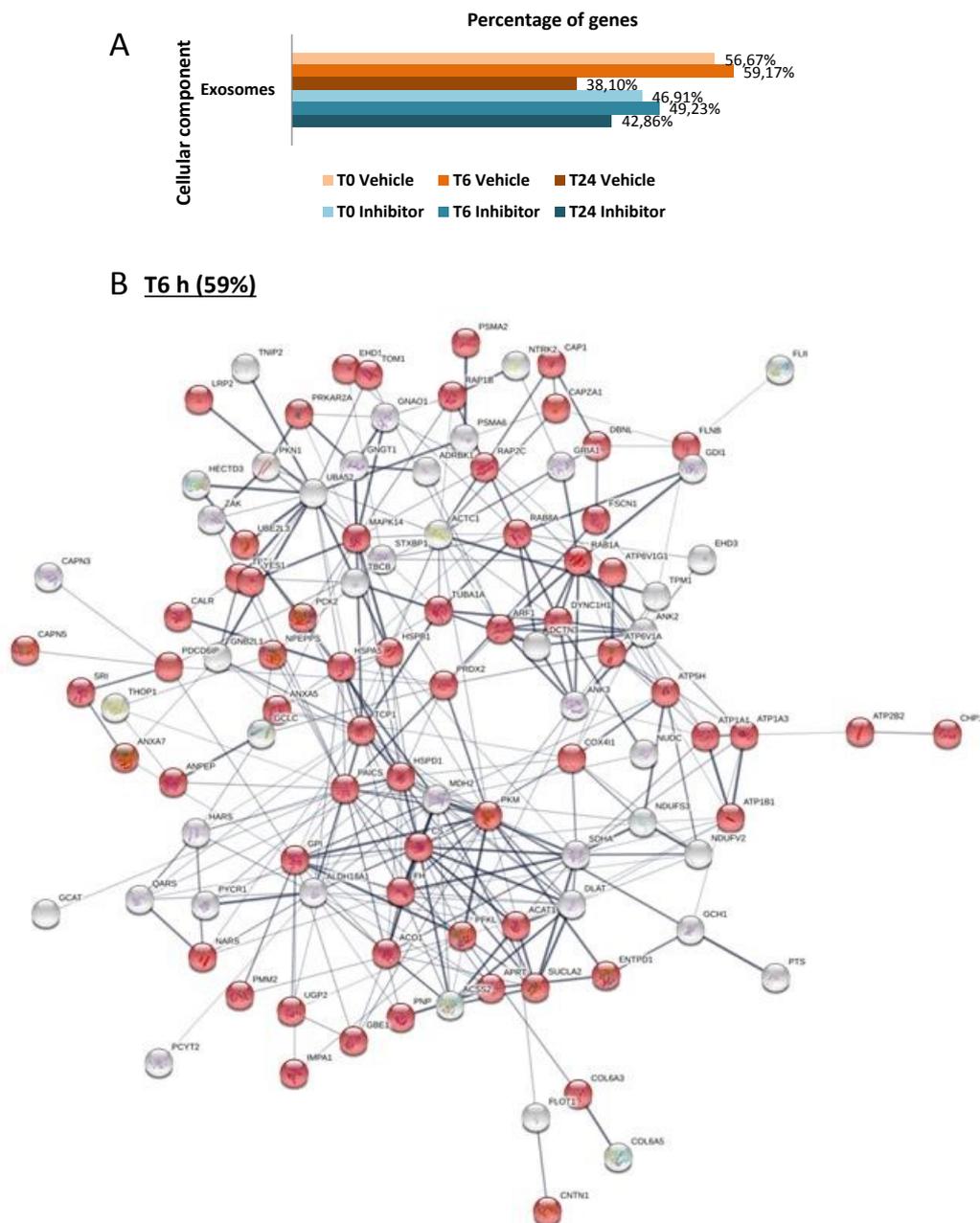


Figure 44 : Analyse par le logiciel Funrich des component cellulaires, exosomes et réseaux des protéines exosomales à T6h post-lésion véhicule. (A) Analyse par le logiciel Funrich montrant le pourcentage de protéines associées aux exosomes, par rapport au nombre total de protéines pour chaque condition. (B) Le réseau montre les protéines exosomales (rouge) à T6h post-lésion véhicule à l'aide du logiciel STRING.

De façon globale, les données protéomiques montrent d'une part qu'au point de la lésion, plusieurs processus participant à la réparation sont dépendants de la voie de signalisation ALK4/5. Ces résultats suggèrent d'autre part qu'une partie de ce dialogue neuroprotecteur est médié par les exosomes. Ils soulèvent alors de nombreuses

questions afin d'élucider les processus chronologiques et moléculaires du dialogue entre les différentes sous-populations microgliales et les neurones au point de la lésion, conduisant à une réparation nerveuse efficace.

3.2. Étude préliminaire des signatures protéomiques des cellules microgliales issues des ganglions nerveux vs. des connectifs

Les résultats ont montré que les cellules microgliales, selon qu'elles soient dans les ganglions nerveux ou dans les connectifs, participent à la réponse dépendante de la signalisation ALK4/5 après la lésion. Pour comprendre davantage leurs fonctions et leurs rôles respectifs post-lésion, les différences entre ces deux sous-populations microgliales connectif et ganglionnaire ont été étudiées par approche protéomique.

De ce fait, nous avons réalisé des expériences préliminaires après prélèvement des cellules microgliales dans leur compartiment respectif. Après analyse des profils protéiques de ces deux populations de cellules microgliales, l'identification et l'analyse statistique a permis d'obtenir une première comparaison (Figure 45, Annexe 7). Ces résultats préliminaires ne peuvent pas encore nous renseigner sur les différentes caractéristiques fonctionnelles de chaque sous-population. Néanmoins, ce « Heatmap » met en évidence qu'il existe des différences significatives entre ces deux sous-populations microgliales.

Réalisées en fin de thèse, ces expériences préliminaires soulèvent de nombreuses questions et méritent d'être menées jusqu'à l'identification des fonctions exercées par les deux sous-populations microgliales. Les résultats permettront de mieux comprendre les caractéristiques imposées par leur microenvironnement et leur localisation vis-à-vis des neurones (axone ou corps cellulaire).

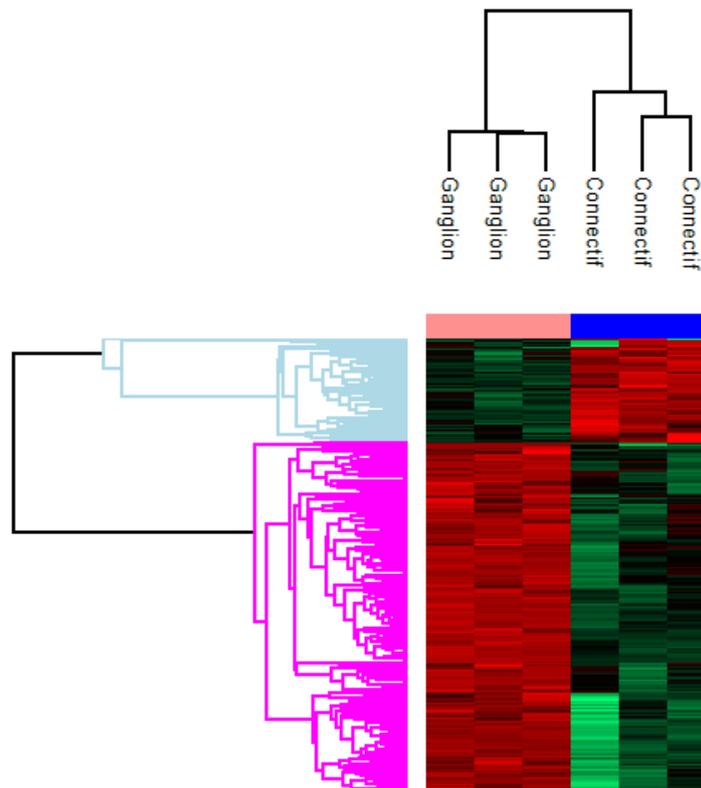


Figure 45 : Heatmap des analyses protéomiques de cellules microgliales ganglionnaires et celles des connectifs. A partir d'un triplicat biologique pour chaque condition, l'identification protéique par MaxQuant et le traitement statistique des valeurs de LFQ via Perseus permettent de générer un Heatmap de la variabilité spécifique existant entre les protéines communes des cellules microgliales ganglionnaires et celles des connectifs. Les groupes de surreprésentation protéique sont présentés (en rouge) par rapport aux sous-représentations (en vert) et sont corrélés aux types de cellules microgliales.

4. Etude du dialogue entre cellules microgliales et neurones médié par des vésicules nGDF⁺

Les études menées au laboratoire sur le dialogue entre les neurones et la microglie ont depuis quelques années mis en évidence des structures de très petite taille en interaction avec les neurones (Figure 46).

Ces nanostructures ne sont pas observées lorsque les neurones sont cultivés seuls. Elles ne sont observées que lorsque les cellules microgliales sont co-cultivées avec les neurones. C'est pourquoi, des travaux plus spécifiques se sont intéressés à la production de vésicules extracellulaires (VEs) par les cellules microgliales. Tout d'abord, des études d'immunomarquage ont été réalisées en utilisant des anticorps dirigés contre une molécule considérée comme un marqueur spécifique de VEs, Alix,

caractérisée depuis peu au laboratoire (Mathivanan & Simpson, 2009; Théry et al., 2001).

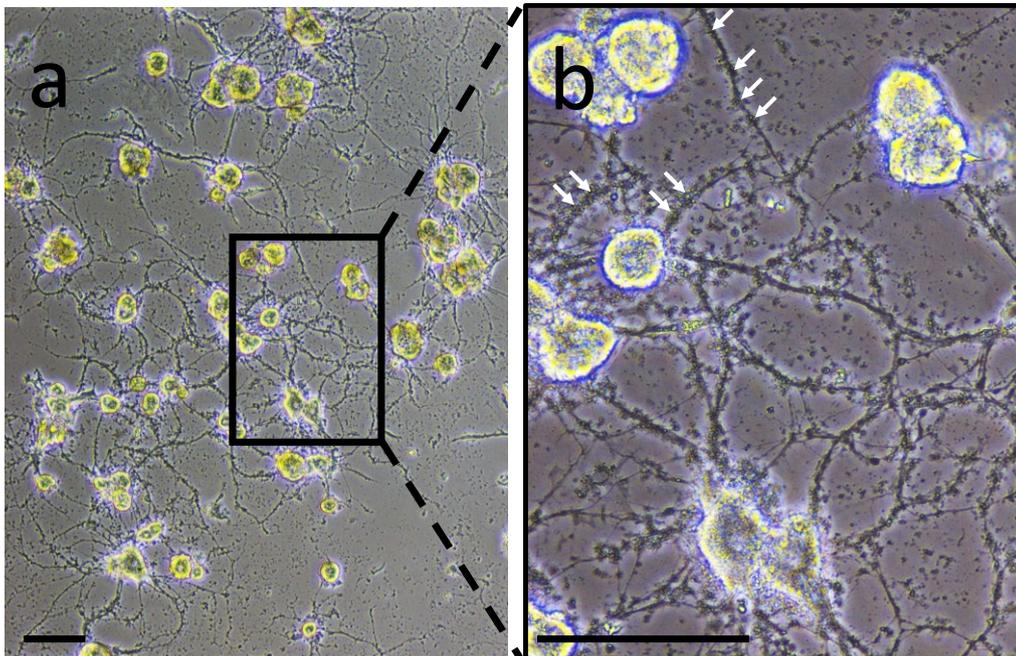


Figure 46 : Co-culture primaire de cellules microgliales et neurones. (A) Co-culture de neurones adhérents en pleine croissance neuritique avec des cellules microgliales en suspension. Le renouvellement du milieu de culture a emporté les cellules microgliales tout en maintenant les neurones et certains produits libérés des deux populations de cellules. (B) Elargissement montrant des structures ressemblant à des vésicules interagissant avec les neurites (flèches blanches à titre d'exemple). Les barres d'échelle correspondent à 50 μm .

Dans ce contexte, des nanostructures immunopositives pour Alix ont été observées dans la zone d'accumulation microgliale au point de la lésion, ainsi que dans les espaces interneuronaux dans les ganglions, là où se trouvent les cellules microgliales ganglionnaires. Le marquage atteste qu'il s'agit bien de vésicules extracellulaires. De plus, ces résultats suggèrent que les VEs sont d'origines microgliales. Deux doctorants, Tanina Arab et Quentin Lemaire, étudient respectivement les contenus en protéines et en ARNs dans ces VEs microgliales. A la suite des résultats obtenus par analyse protéomique LESA de la zone de lésion, mes travaux ont également montré l'importance de la production exosomale dans la réponse à la lésion (Figure 44). Précisons tout de même qu'aujourd'hui dans la littérature, les données moléculaires ne permettent pas de spécifier le type de VEs qu'il s'agisse d'exosomes ou de microvésicules (ectosomes). Du fait que la réponse à la lésion mette en jeu un nombre important de signatures vésiculaires, certaines des expériences dans cette partie de

mon travail ont été réunies à celles de Tanina et Quentin. De ce fait, des protocoles d'enrichissement de VEs ont été développés par Tanina et Quentin pour montrer la production de VEs à partir des cellules microgliales. Leur enrichissement a également été vérifié en microscopie électronique. Les observations ont démontré que les cellules microgliales produisent des vésicules extracellulaires allant d'environ 100 à 300 nm de diamètre (Figure 47).

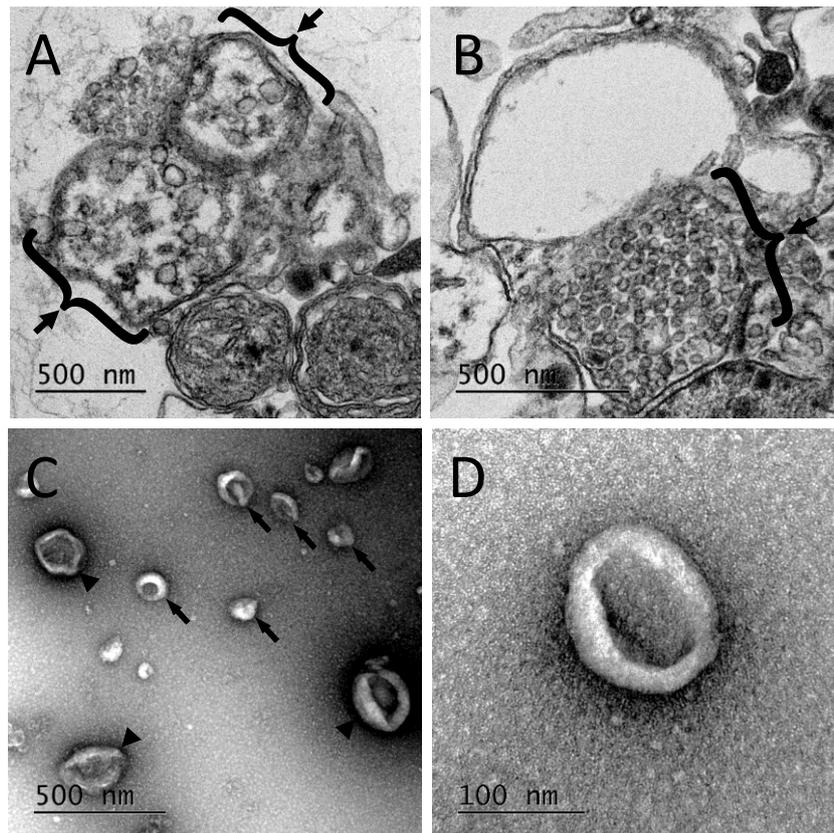


Figure 47: Microscopie électronique à transmission (MET) des vésicules extracellulaires de cellules microgliales chez la sangsue. (A et B) Cryosections de microglies isolées contenant dans le cytoplasme des corps multivésiculaires (entre l'accolade), structures typiques de la biogenèse des exosomes. (C et D) Analyses morphologiques de vésicules extracellulaires libérées par la microglie recueillies par ultracentrifugations différentielle de milieu conditionné de cellules microgliales primaire. Ces fractions enrichies en EV ont révélé la présence de vésicules dans une plage de taille de 50 à 300 nm (C) dont la plupart se situent autour de 100 nm (D).

Des expériences supplémentaires, ayant pour but d'évaluer l'implication des VEs d'origines microgliales dans un dialogue spécifique avec les neurones, ont démontré que les VEs issues de la microglie ont une capacité d'interaction forte avec les neurones. Dans des expériences de co-culture de neurones et de cellules microgliales, un immunomarquage utilisant un anticorps anti-gliarine, un marqueur microglial, a permis d'observer les VEs spécifiquement microgliales (Figure 48) (F. Drago et al.,

2014; Y. X. Xu et al., 1999). Les résultats montrent que les VEs microgliales sont capables d'interagir très étroitement avec les neurones et plus précisément les neurites (Figure 48A). Cette interaction est probablement très active car même les renouvellements de milieu n'ont altéré leur contact avec les neurones adhérents alors même que les cellules microgliales semi-adhérentes ont été éliminées dans ces changements. Aucun signal n'est observé en utilisant l'anticorps secondaire seul comme contrôle négatif (Figure 48B). L'origine microgliale de ces VEs a été vérifiée en utilisant le même immunomarquage anti-gliarine sur des neurones cultivés seuls (Figure 48C). L'absence totale de signal vésiculaire démontre effectivement l'origine microgliale de ces VEs.

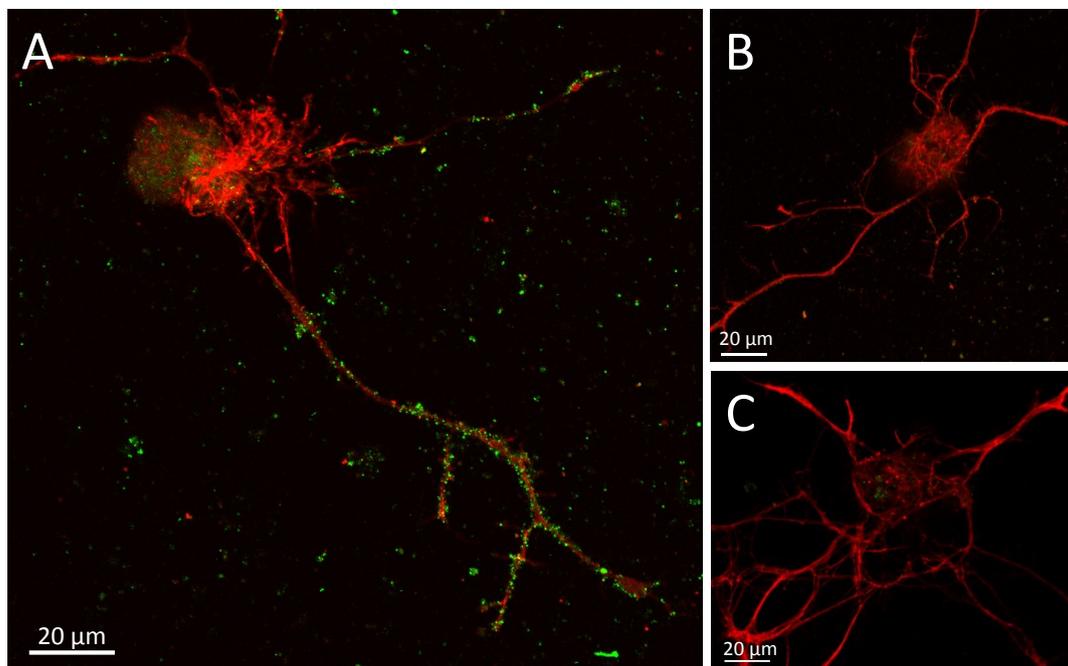


Figure 48: Analyses par immunofluorescence avec un anticorps monoclonal de souris anti-gliarine de sangsue sur des cultures de cellules nerveuses de sangsue. Les images montrent des agrandissements de neurones uniques représentatifs de la culture complète. (A) La co-culture de neurones et de microglie montre un marquage anti-gliarine (vert) de vésicules associées à des neurites. (B) Aucun signal spécifique n'a été observé dans la même co-culture traitée avec l'anticorps secondaire seul comme témoin. (C) L'anti-gliarine n'a montré aucun marquage de vésicules dans une culture de neurones seuls. Les corps cellulaires des neurones ont été contre-colorés avec de la phalloïdine conjuguée à la rhodamine (rouge). Les barres d'échelle correspondent à 20 μm.

Le travail de Tanina Arab a initié l'étude des propriétés biologiques des VEs microgliales. Présumant qu'elles puissent intervenir comme médiateur entre microglie et neurones, ses résultats ont montré, par des tests *in vitro*, qu'elles ont une capacité à induire la croissance neuritique sur des neurones de sangsue (Figure 49). En effet,

l'ajout de la fraction enrichie en VEs aux neurones a permis d'augmenter significativement la croissance des neurites au cours du temps par rapport à l'ajout du surnageant contrôle issu de l'enrichissement.

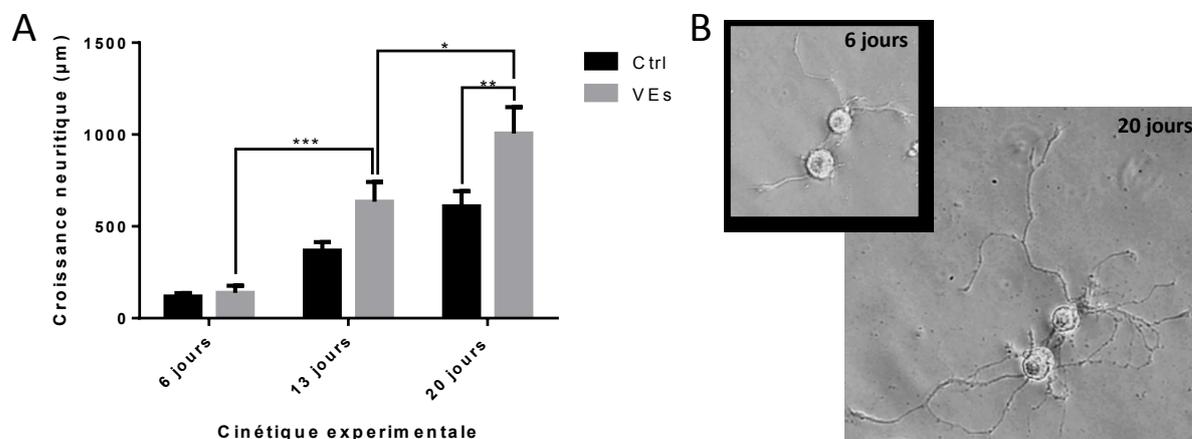


Figure 49: Influence des VEs microgliales sur la croissance neuritique in vitro. (A,B) Les neurones de sangsue sont cultivés en présence de la fraction enrichie en VEs (gris) ou en présence du surnageant contrôle (Ctrl, noir). (A) Les mesures de longueur neuritique ont été effectuées sur des neurones individuels aux jours 6, 13 et 20 de la culture. Les résultats présentent une croissance au jour 20 significativement plus importante dans la condition contenant la fraction enrichie en VEs. Les différences statistiques calculées par test ANOVA sont significatives avec * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$. Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne. (B) Les images montrent l'agrandissement de deux neurones représentatifs de la culture complète observés individuellement entre le jour 6 (cadre en haut à gauche) et le jour 20 (cadre principal) dans des conditions d'incubation avec la fraction enrichie en VEs. Les barres d'échelle correspondent à 20 μm .

En ayant connaissance de ces données, après avoir amorcé l'étude du dialogue dépendant de la voie de signalisation ALK4/5 entre les cellules microgliales et les neurones chez la sangsue, mon travail s'est également intéressé à la possibilité que ce dialogue dépendant d'ALK4/5 soit médié en partie par des vésicules extracellulaires. De plus, mes résultats précédents ont montré que les cellules microgliales, dans les ganglions nerveux, portent l'ARNm *ngdf* (Figure 36). La protéine nGDF s'est révélée bien présente à l'intérieur de certaines cellules microgliales, et de surcroît dans les espaces intercellulaires des ganglions (Figure 37). Ce signal avait déjà suscité notre curiosité car il est même possible de l'observer sous un aspect ponctiforme au sein des ganglions nerveux, ce qui suggérait déjà qu'il puisse correspondre à des structures vésiculaires (Figure 37). C'est pourquoi, des expériences d'immunofluorescence anti-nGDF ont été renouvelées, de la même manière, dans des conditions T0h, T6h et T24h suite à une lésion afin de préciser la nature de ce signal (Figure 50B-D). Les résultats

montrent un marquage autour des neurones, à l'emplacement des cellules microgliales ganglionnaires. Ce signal nGDF est effectivement très ponctiforme et en plus il augmente en fonction du temps. On peut observer dans le temps précoce (T0) que ce marquage nGDF ponctiforme est inexistant autour des neurones (Figure 50A). La présence de ce marquage débute de manière faible à partir de T6h (Figure 50B), et une augmentation importante est détectée à T24h post-lésion (Figure 50C). Il est aussi étroitement lié aux noyaux de cellules microgliales et pourrait correspondre à des VEs d'origine microgliale (Figure 50B et C).

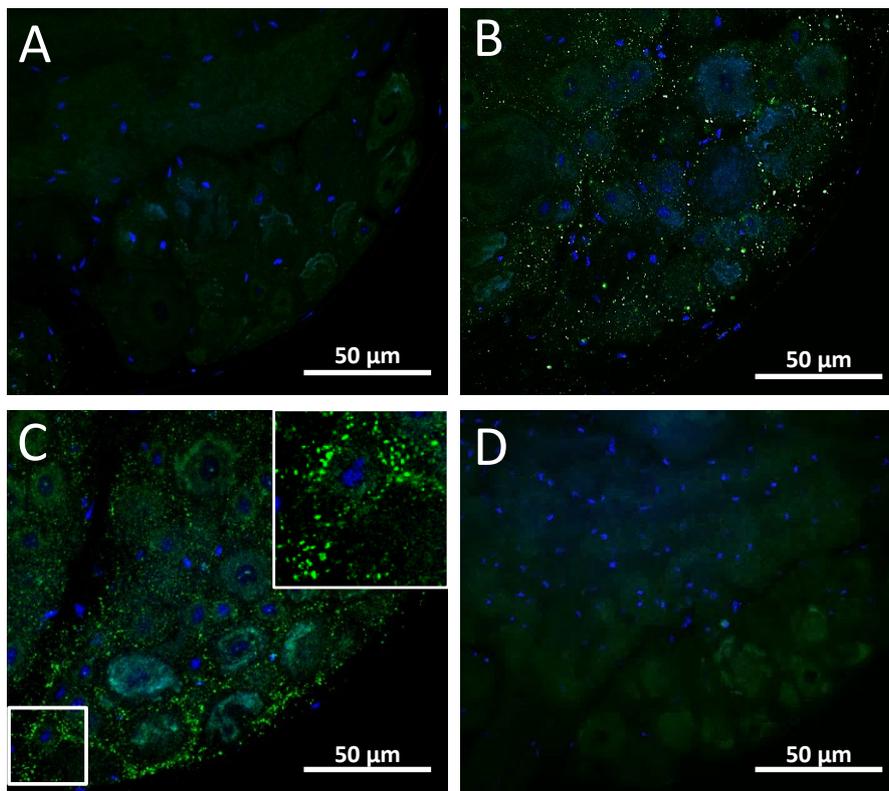


Figure 50: Analyse par microscopie confocale de l'immunofluorescence du nGDF après la lésion des connectifs, à l'aide d'anticorps polyclonaux de lapin anti-TGF- β humain. (A) L'image d'une zone de ganglion nerveux sur des chaînes T0h montre un signal ponctiforme immunopositif pour nGDF (vert) (B) ou cultivés *ex vivo* 6h (C) et 24h suite à une lésion du connectif. Dans les ganglions, l'immunomarquage nGDF (vert) a montré un signal ponctiforme dans les espaces interneuronaux, conformément à la place naturelle de la microglie ganglionnaire mise en évidence par les noyaux contre-colorés avec Hoechst 33342 (bleu). L'encadré (C) présente un grossissement du cadre montrant le détail des vésicules immunopositives du nGDF entourant les corps cellulaires des neurones. (D) Aucun signal n'a été détecté dans les tissus traités uniquement avec un anticorps secondaire en tant que contrôle négatif.

Dans ce contexte, ces résultats d'immunofluorescence dans des structures vésiculaires combinés à la démonstration de la localisation par hybridation *in situ* du transcrit *ngdf* (Figure 36) et de sa protéine (Figure 37) dans les cellules microgliales permettent

d'émettre l'hypothèse que le nGDF pourrait être libéré par les cellules microgliales en réponse à la lésion par l'intermédiaire de vésicules extracellulaires (VEs). Cette hypothèse a été confirmée par l'enrichissement des vésicules extracellulaires à partir de cellules microgliales prélevées et mises en culture primaire, selon les procédures utilisées par Tanina Arab et Quentin Lemaire. A la suite d'une série d'ultracentrifugations successives, les extraits protéiques ont été analysés par western blot en utilisant le même anticorps polyclonal anti-TGF- β humain que précédemment. Le résultat a confirmé la présence dans les VEs d'origines microgliales d'un produit unique reconnu spécifiquement par cet anticorps dirigé contre le peptide actif de type TGF- β (Figure 51A). Puisque nous savons que les cellules microgliales produisent nGDF et que ce signal est parfaitement identique entre VEs microgliales (piste 1) et cellules microgliales (piste 2), nous pensons que ce membre correspond à une forme du nGDF. De plus, des expériences en immunofluorescence ont démontré que le marquage nGDF (Figure 51B) et le marquage Alix (Figure 51C), qui est un marqueur des VEs sont co-localisés autour de corps cellulaires neuronaux dans les ganglions (Figure 51D). Ces résultats confirment que ce marquage positif ponctiforme correspond à des VEs.

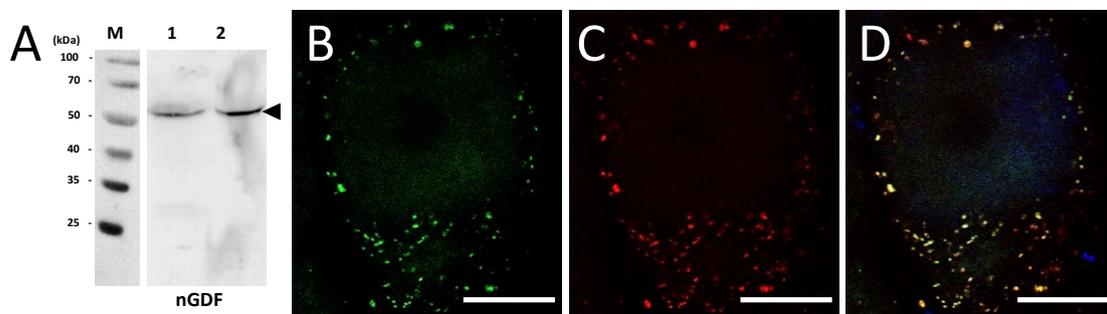


Figure 51 : Analyse par Western blot d'extraits de protéines issus de vésicules extracellulaires d'origine microgliales ou de cellules microgliales et double immunomarquage en utilisant des anticorps anti-TGF- β 1 et anti-Alix. (A) Le western blot a été réalisé à partir soit de vésicules extracellulaires d'origine microgliale (ligne 1) soit de cellules microgliales (ligne 2) en utilisant des anticorps polyclonaux de lapin anti-TGF- β humain (lignes 1,2). Le marqueur de poids moléculaire est présenté en ligne M. (B-D) Double immunomarquage en utilisant des anticorps anti-TGF- β 1 humain et anti-Alix humain sur un cordon nerveux T24h après lésion. Plusieurs vésicules extracellulaires entourant autour de neurones sont immunopositives pour le nGDF (B, vert) et Alix (C, rouge). (D) Les deux signaux se localisent (en jaune) dans la plupart des vésicules. Les noyaux cellulaires sont contre-colorés par Hoechst comme indiqué ci-dessus. Les barres d'échelle correspondent à 10 μ m.

Pour étudier l'importance des vésicules nGDF⁺ dans le rôle neurotrophique des VEs microgliales sur les neurones, des tests de croissance neuritique ont de nouveau été effectués sur des neurones de sangsue en culture primaire selon le même protocole

que celui développé en collaboration avec Tanina. L'objectif est de savoir si l'effet neurotrophique des vésicules extracellulaires produites par les cellules microgliales pourrait dépendre de nGDF et éventuellement d'une voie ALK4/5.

Les neurones ont été mis en culture sous 3 conditions différentes: contrôle (milieu de culture seul), milieu de culture + VEs microgliales, milieu de culture + VEs microgliales + inhibiteur SB 431542. Si les résultats sur les mesures de croissance neuritique démontrent sans ambiguïté, comme précédemment (Figure 52) au jour 20, l'effet positif qu'exercent les VEs microgliales sur la croissance neuritique, la présence de l'inhibiteur SB431542 dans le milieu de culture a ici déclenché une perte significative de l'induction de la croissance neuritique médiée par les VEs microgliales.

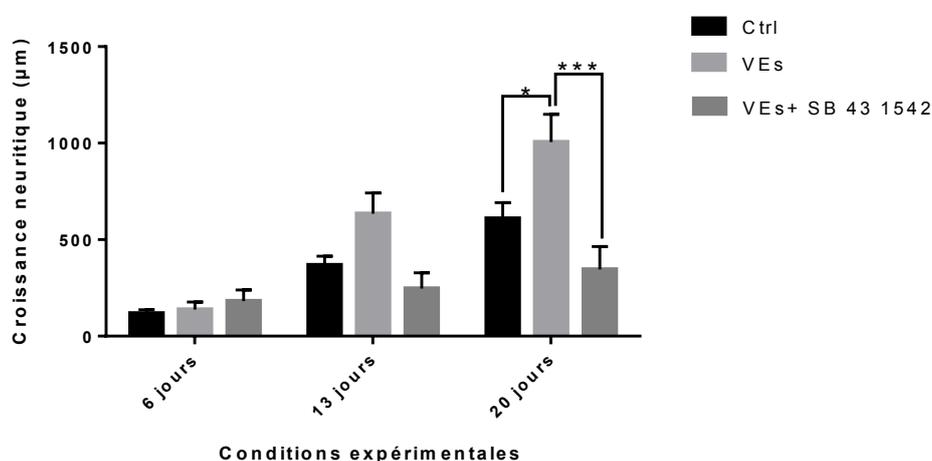


Figure 52: Influence des VEs microgliales sur la croissance neuritique in vitro dans un contexte dépendant d'ALK4/5. Les neurones de sangsue sont cultivés en présence de la fraction enrichie en VEs (gris clair), ou de la fraction enrichie en VEs + inhibiteur SB 431542 (gris foncé), ou en présence du surnageant contrôle (Ctrl, noir). Les mesures de longueur neuritique ont été effectuées sur des neurones individuels aux jours 6, 13 et 20 de la culture. Les résultats présentent une croissance au jour 20 significativement plus importante dans la condition contenant la fraction enrichie en VEs. Cette augmentation est abolie lorsque les cellules sont incubées avec les VEs et l'inhibiteur SB 431542. Les différences statistiques calculées par test ANOVA sont significatives avec * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$. Les barres d'erreur représentent l'écart à la moyenne.

Dans l'ensemble, ces résultats démontrent l'implication de la voie de signalisation ALK4/5 dans les mécanismes qui régissent la croissance neuritique médiés par les VEs d'origine microgliale. Néanmoins, il est aussi possible que ce rôle neurotrophique dépendant de la voie ALK4/5 soit également, dans le système nerveux *in situ*, médié par une forme de nGDF libre. Pour rappel, il a été possible de vérifier, en effet, que le

récepteur ALK4/5 neuronal pouvait réagir à la présence d'un membre de la famille TGF- β libre pour l'induction de la croissance neuritique.

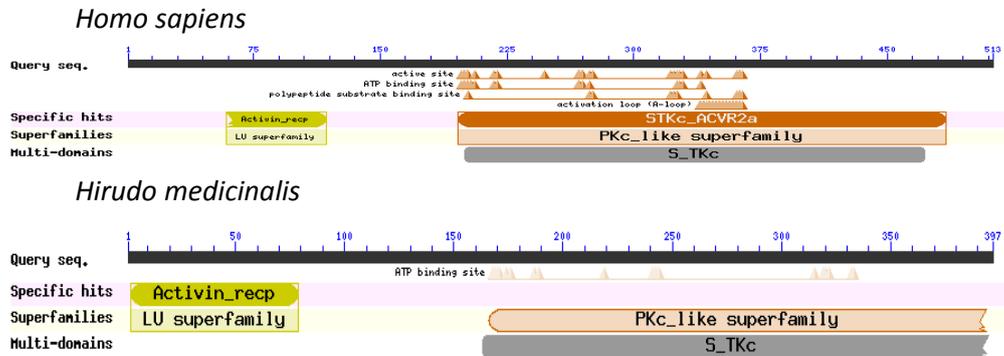
A ce stade, on ne peut pas connaître exactement dans une situation *in-vivo* après lésion la part naturelle portée par les vésicules extracellulaires nGDF+ d'origine microgliale dans le rôle neurotrophique par rapport à celle du nGDF libre. En revanche il est possible par ces résultats de mettre en lumière l'importance que peuvent avoir les VEs d'origine microgliale sur le métabolisme neuronal et leur capacité à restaurer leurs prolongements.

5. Résultats préliminaires sur la caractérisation de la Voie de signalisation ALK4/5

A ce stade, tous les résultats ont contribué à la caractérisation et l'étude fonctionnelle du récepteur de type I au TGF- β (ALK4/5) et de son ligand nGDF, tous deux essentiels dans le processus de réparation. C'est la raison pour laquelle des expériences préliminaires ont été engagées afin d'en savoir plus sur la voie de signalisation ALK4/5 chez la sangsue. Ainsi, des expériences ont été effectuées pour étudier la cascade de la signalisation ALK4/5. Par exemple, le récepteur de type II au TGF- β qui formerait un hétérodimère avec ALK4/5 pour devenir fonctionnel, n'a pas été étudié fonctionnellement. Le récepteur hétérodimère est en effet composé de deux récepteurs kinases à serine/thréonine : le récepteur de type I, déjà caractérisé comme ALK4/5 et un récepteur de type II, qui serait, selon les données connues pour ALK4 ou 5, un récepteur ACTRIIA ou B (Activin Receptor kinase type II-A ou II-B) (Walker et al., 2016). Après interaction avec son ligand, dans notre cas le nGDF, le récepteur de type II activerait le récepteur de type I par une phosphorylation. A son tour, le récepteur de type I activerait une série de phosphorylations cytoplasmiques faisant intervenir les protéines SMADs. Dans notre cas la voie ALK4/5 ferait intervenir les protéines SMAD 2/3 pour les phosphorylations cytoplasmiques (J. He et al., 2013). C'est pourquoi, notre intérêt s'est porté sur la présence d'un récepteur de type II, ACTRIIA ou ACTRIIB chez la sangsue et sur la présence d'une protéine SMAD 2/3. Des recherches dans les bases de données de sangsue ont montré l'existence de molécules apparentées au récepteur IIA

à l'activine ou ACTRIIB (Figure 53A) et à certaines protéines SMADs, dont SMAD 2/3 (Figure 53B). Ces séquences protéiques de sangsue présentent les mêmes domaines conservés que ceux portés par les molécules homologues chez les mammifères.

A Activine récepteur type-IIB



B SMAD 2/3

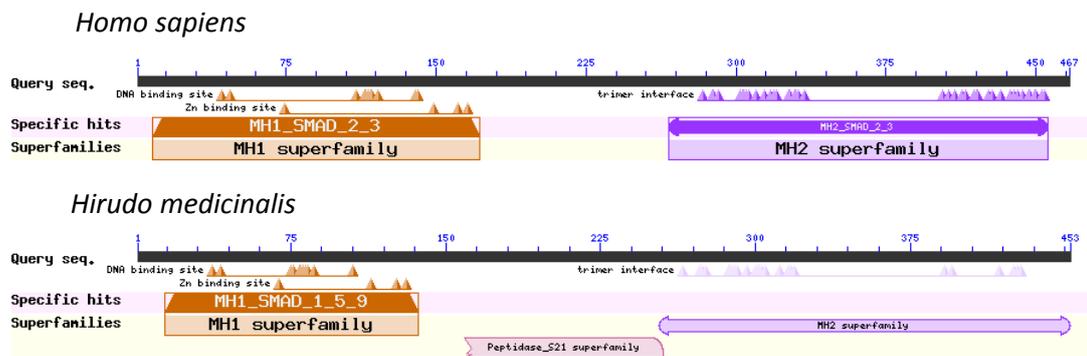


Figure 53: Caractérisation bio-informatique de récepteur de type IIB à l'activine et de SMAD2/3. Comparaison avec les molécules humaines de la séquence putative du récepteur de type-IIB à l'activine (A) et de la séquence SMAD 2/3 (B), montrant les domaines conservés entre *Hirudo medicinalis* et *Homo sapiens* (Blast P).

Ensuite, après avoir vérifié que les séquences immunogènes utilisées pour leur production sont présentes et homologues dans la protéine de sangsue, des anticorps dirigés contre les régions conservées de ces formes humaines (anti-ACTRIIB et anti-SMAD2) ont été utilisés. La localisation de la protéine apparentée à ACTRIIB (Activine Récepteur Type IIB) a été étudiée par immunofluorescence dans une culture primaire de neurones de sangsue (Figure 54). Les résultats montrent que le récepteur putatif ACTRIIB et le récepteur ALK4/5 sont co-localisés dans certains neurones.

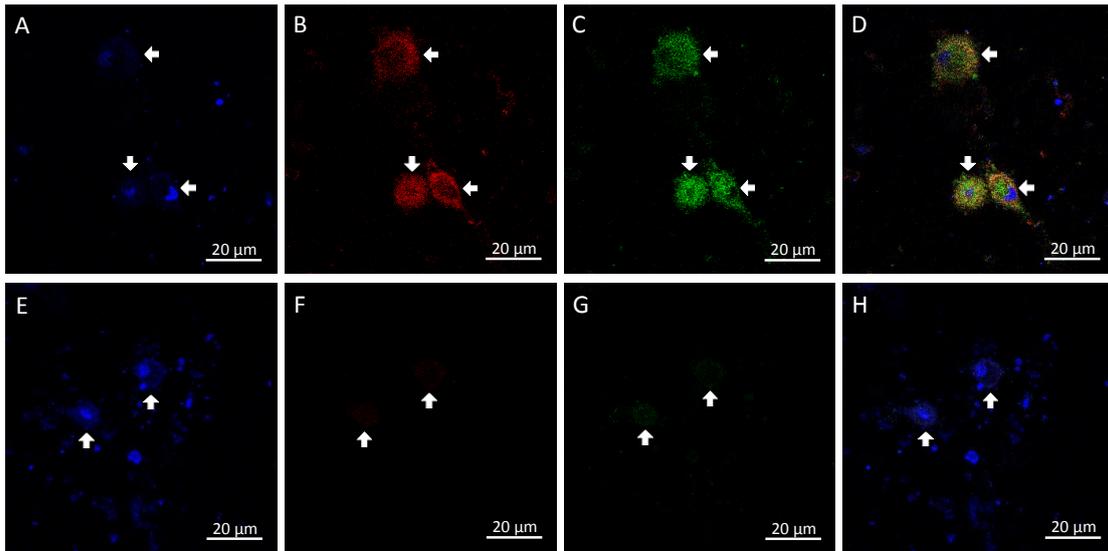


Figure 54: Analyse par microscopie confocale de co-marquage ALK5 et ACTRIIB obtenue sur des cultures primaires de neurones. Les expériences d'immunofluorescence ont été réalisées avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-ALK5 humain (rouge, B et F) et anticorps polyclonal de chèvre anti-ACTRIIA humain (vert, C et G). Les cellules sont marquées au niveau de leur noyau par le Hoechst 33342 (bleu, A et E). Les trois signaux du noyau, ALK5 et ACTRIIB sont superposés en D et H. Aucun signal n'a été détecté dans les neurones traités uniquement avec un anticorps secondaire en tant que contrôle négatif (E-H).

Concernant la protéine SMAD 2/3, des expériences préliminaires d'immunofluorescence ont été réalisées, là encore, sur des cultures primaires de neurones. Les résultats montrent un marquage immunopositif (en vert) à l'intérieur de corps cellulaires neuronaux qui n'est pas observé avec l'anticorps secondaire seul (Figure 55). Ce résultat est intéressant car il confirme par son signal SMAD 2/3⁺ que les neurones puissent être sollicités via ALK4/5, comme cela a été montré auparavant.

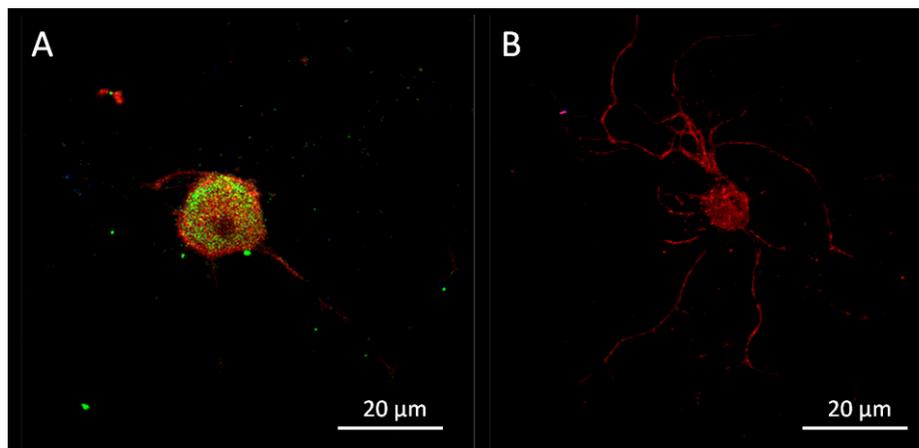


Figure 55: Analyse par microscopie confocale du marquage SMAD2/3 obtenue sur des cultures primaires de neurones. Images de microscopie confocale à fluorescence obtenues après immunofluorescence sur une culture de neurones de sangsue en utilisant l'anticorps polyclonal anti-SMAD 2 humain (vert). Les neurones sont révélés à l'aide de la phalloïdine couplée à la rhodamine (rouge).

Ces résultats montrent la probable présence d'un récepteur de type II co-localisé avec le récepteur de type I ALK4/5. Ils montrent également la présence d'une molécule apparentée à SMAD 2/3 dans les neurones. Néanmoins, une caractérisation plus précise doit être réalisée pour confirmer les résultats, de même que des expériences supplémentaires pour comprendre si cette protéine SMAD2/3 est sous l'influence de la voie ALK4/5.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les maladies du système nerveux touchent en moyenne 1 personne sur 8 en Europe et représentent un tiers du coût humain des maladies. Ces maladies sont diverses. Cependant, une grande partie des recherches se focalise sur les maladies neurodégénératives. Ces maladies augmentent avec le vieillissement de la population et du fait de l'absence de traitements curatifs, le nombre de personnes touchées devrait croître de manière régulière dans les années à venir. Le coût économique de ces maladies a atteint 800 milliards d'euros pour l'Europe en 2010. Les deux maladies neurodégénératives le plus fréquentes sont la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Environ 25 et plus de 6,5 millions de personnes sont touchés dans le monde, respectivement. Ces maladies sont corrélées à un état de neuroinflammation, qui à son tour est régulé grâce au dialogue entre les cellules microgliales et d'autres cellules du système nerveux. De ce fait, les cellules microgliales ont un rôle crucial dans les maladies neurodégénératives. Elles sont les cellules immunitaires résidentes du SNC contribuant à son développement normal et à son intégrité au cours de la vie. Les cellules microgliales perçoivent sans arrêt leur environnement de manière très dynamique. De ce fait, elles sont constamment en interaction avec les autres cellules gliales, les neurones et leurs synapses. Ces interactions peuvent être médiées par différentes molécules chimioattractantes, telles que le glutamate et l'ATP, et différentes chimiokines (Wake, Moorhouse, Jinno, Kohsaka, & Nabekura, 2009). Les cellules microgliales possèdent des récepteurs pour ces substances et y répondent efficacement (Hanisch & Kettenmann, 2007). Elles sont capables de détecter tout changement dans leur microenvironnement et d'y réagir en conséquence (Nimmerjahn et al., 2005). Les cellules microgliales ont un rôle très important dans les conditions normales du SNC. Néanmoins, leurs rôles en conditions normales sont encore mal connus comparé à ceux décrits dans des conditions pathologiques (Arcuri, Mecca, Bianchi, Giambanco, & Donato, 2017; Parkhurst et al., 2013; Zhan et al., 2014). Les études en conditions pathologiques montrent de plus en plus une corrélation entre la microglie dysfonctionnelle et un niveau élevé de la neuroinflammation conduisant à des neuropathologies (Li & Barres, 2017; Prinz & Priller, 2017). C'est la raison pour laquelle la compréhension et le contrôle des activités des cellules microgliales sont

essentiels afin de pouvoir apporter à long terme des voies thérapeutiques. Il devient donc crucial d'en comprendre davantage sur les fonctions des cellules microgliales.

Chez les modèles mammifères, bien que les outils transgéniques soient très nombreux, les études des cellules microgliales ne sont pas aisées. En premier lieu, les cellules microgliales ne sont pas les uniques macrophages du SNC. Il existe aussi les macrophages périvasculaires, les macrophages méningés et les macrophages des plexus choroïdes (Li & Barres, 2017). Dans les tissus, il a été démontré que ces macrophages du SNC ont plusieurs rôles importants dans le bon fonctionnement du SNC, tels que l'élimination des débris et des cellules en apoptose, la régulation de la résistance vasculaire et le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) ainsi que la régulation de l'inflammation (Herz et al., 2017). De plus, dans certains cas pathologiques, la rupture de la BHE peut causer une infiltration importante de macrophages sanguins qui deviendront autant de cellules myéloïdes, encore une fois difficiles à différencier fonctionnellement des cellules microgliales résidentes. En conséquence, le prélèvement microgliale à partir de tissus nerveux pour mener des analyses moléculaires, par exemple, nécessite de suivre un protocole d'isolement particulièrement drastique pour les discriminer des autres macrophages. Toutefois possible, à ce prélèvement s'ajoute la grande versatilité de leur phénotype en fonction de micro-changements opérés par leur dissociation.

C'est dans ce contexte chez les mammifères que la diversité et la plasticité cellulaires représentent un grand défi à la compréhension des cellules microgliales. C'est pourquoi, récemment, plusieurs études se sont focalisées sur la distinction des cellules microgliales par rapport aux autres cellules macrophagiques dans le SNC. Ainsi, de nouveaux marqueurs spécifiques à la microglie ont été étudiés, mettant notamment en évidence l'implication du récepteur TGF- β de type I (TGF- β R1), du récepteur purinergique P2ry12, du récepteur FCRL5, de l'hexosaminidase beta (HEX β) et de la protéine transmembranaire TMEM119 (Butovsky et al., 2014). Les auteurs ont également décrit le récepteur du TGF- β R1 comme essentiel dans la régulation de la maturation microgliale. D'autres études ont confirmé par une comparaison entre la microglie et les macrophages péritonéaux qu'il existe une expression préférentielle dans les cellules microgliales des ARNm *tgfb1* et *tgfb2* codant respectivement pour

les récepteurs au TGF- β de type I (alias ALK5) et de type II (Gosselin et al., 2014). Un traitement par du TGF- β et du M-CSF (facteur stimulant les colonies de macrophages) a un effet préférentiel sur le programme d'expression génique spécifique de la microglie par rapport à l'influence du M-CSF seul (Gosselin et al., 2014). Les macrophages péritonéaux traités avec du TGF- β induisent par ailleurs la transcription de certains gènes spécifiques de la microglie. La suppression spécifique des récepteurs au TGF- β entraîne également une microglie réactive aberrante, qui présente également des niveaux réduits de Sall1, un facteur de transcription spécifique de la microglie impliqué dans le maintien de l'état physiologique de la microglie adulte (Buttgereit et al., 2016). Dans le même sens, le TGF- β libéré par les astrocytes contribue à la ramification et au maintien de la microglie, influençant fortement la survie de la microglie en condition *in vitro* (Bohlen et al., 2017; Schilling, Nitsch, Heinemann, Haas, & Eder, 2001). Dans le contexte de sclérose amyotrophique latérale, la surexpression anormale de TGF- β astrocytaire cause par ailleurs des phénotypes microgliaux délétères contribuant à la pathologie (Endo et al., 2015).

Suivant ce qui a été présenté précédemment, il ne fait aucun doute que l'étude de la signalisation TGF- β est cruciale pour comprendre les fonctions physiologiques de la microglie. C'est pourquoi, nous avons entrepris des recherches sur les modalités de production du récepteur au TGF- β de type I dans le SNC de la sangsue.

Les cellules microgliales chez la sangsue partagent plusieurs caractéristiques avec celles chez les vertébrés. Elles sont également mobiles (Morgese et al., 1983), migrant vers les lésions après avoir subi des modifications morphologiques (Croq et al., 2010). Elles sont capables de phagocytose (Le Marrec-Croq et al., 2013) et peuvent être étudiées dans les tissus à l'aide de la molécule de liaison au calcium Iba1 (F. Drago et al., 2014). De plus, la compréhension de ces cellules microgliales s'avère très intéressante, depuis que l'on sait qu'elles sont essentielles pour la réparation du système nerveux (Ngu et al., 2007) et que leur accumulation au niveau de la lésion est soutenue par des signaux chimiotactiques déjà largement décrits chez la sangsue (Arafah et al., 2013; Croq et al., 2010; F. Drago et al., 2014; Duan et al., 2009; Schikorski et al., 2009; Tahtouh et al., 2009, 2012).

La sangsue présente de nombreux avantages pour lesquels elle est considérée comme un bon outil d'étude des cellules microgliales. Un des avantages est l'accès facile aux populations cellulaires, microgliale ou neuronale, à partir de son SNC. Elles peuvent être facilement dissociées et maintenues en culture primaire sans apport de CO₂ et à température ambiante. Cet avantage, est devenu encore plus intéressant, depuis que certaines études ont montré une différence entre les lignées immortalisées de cellules microgliales et la microglie fraîchement dissociée (Butovsky et al., 2014). En conséquence, l'utilisation de la culture primaire microgliale naturelle est désormais reconnue comme indispensable. De plus, grâce à la structure tubulaire du SNC chez la sangsue, il est possible de réaliser une lésion mécanique au milieu des connectifs pour endommager uniquement les axones alors que les corps cellulaires neuronaux sont encore intacts. Par ailleurs, au vu du nombre important de publications portant sur la microglie chez les mammifères et la grande diversité de situations expérimentales, les réponses microgliales observées sont parfois contradictoires mais représentent en réalité des niveaux de complexité et de subtilité qui dépendent de la nature des lésions et de leur localisation dans le SNC. Contrairement au SNC des mammifères, dans lequel des inhibiteurs de la croissance axonale sont entre autre dérivés des oligodendrocytes et de la myéline, le SNC de la sangsue, dépourvu de myéline, présente des capacités naturelles de régénération axonale après une lésion. En effet, la régénération des axones et des synapses a systématiquement été observée à la fois *in vitro* et *in vivo* (Ngu et al., 2007). De ce fait, cet organisme représente un bon contexte biologique pour des études de guidage axonal, de croissance axonale et de synaptogenèse *in vivo* ou *ex vivo* (Elliot & Muller, 1982; Gao & Macagno, 1988; K J Muller & Scott, 1979).

En outre, lorsqu'une lésion est effectuée au milieu des connectifs, seules les cellules microgliales de ces connectifs s'accumulent au point de la lésion, probablement en raison de l'efficacité des gradients des signaux chimiotactiques provenant du tissu lésé. En conséquence, les sous-populations microgliales provenant des ganglions ou des connectifs peuvent être étudiées séparément pour leurs interactions spécifiques avec les corps cellulaires neuronaux ou les axones, respectivement. Enfin, le déplacement linéaire et rapide des cellules microgliales au point de lésion des connectifs permet de mieux étudier les mécanismes chronologiques de la réponse microgliale.

C'est dans ce contexte que mon travail de thèse s'est concentré sur la voie de signalisation TGF- β chez la sangsue dans le dialogue entre les cellules microgliales et les neurones. Comme nous l'avons évoqué, cette voie s'est révélée cruciale pour le dialogue entre les cellules du SNC en conditions normales comme pathologiques chez les mammifères. L'étude d'un tel modèle constitue une alternative intéressante pouvant donner un nouvel aperçu du dialogue entre microglies et neurones dépendamment de la voie TGF- β à condition bien sûr que les bases moléculaires de ces mécanismes soient conservées évolutivement.

C'est pourquoi, mon travail de thèse a commencé par la recherche de molécules homologues au récepteur au TGF- β de type I. Les résultats ont permis de mettre en évidence l'existence d'un tel récepteur chez la sangsue. La caractérisation de sa séquence a montré la présence des domaines conservés appartenant à ce type de récepteur de type I (Figures 16 et 17), tels qu'un pont disulfure particulier au type I (Boesen et al., 2002) et un domaine GS important pour la liaison au ligand, confirmant ainsi qu'il s'agit bien d'un récepteur au TGF- β de type I et non de type II (Attisano et al., 1996; Wieser et al., 1995). De plus, la présence du motif structurel en boucle L45 a encore apporté une précision à ce récepteur au TGF- β de type I en indiquant qu'il s'agit du sous-groupe « Activin receptor-Like Kinase 4, 5 ou 7 » (ALK4/5/7) (Feng & Derynck, 1997; Persson et al., 1998) (Figures 19 et 20). A ce stade, aucun élément n'apportait de certitude sur l'identité précise de ce récepteur ALK4/5/7. Cependant, grâce à l'identification du ligand dont nous parlerons plus bas, nous sommes arrivés à la conclusion que ce récepteur de type I est un récepteur ALK4/5.

En termes de localisation, l'ARNm *alk4/5* codant pour ce récepteur ALK4/5 a été détecté dans les cellules microgliales des connectifs, plus spécifiquement au point de la lésion où elles se sont accumulées, et dans certains neurones dans les ganglions (Figure 21). En nous focalisant d'abord sur les cellules microgliales à la lésion, les résultats de localisation de la protéine ont montré que ce récepteur ALK4/5 est exposé par une sous-population de cellules microgliales ALK4/5⁺ au point de la lésion (Figure 22). A ce point, comme il est admis que la réponse à la lésion axonale dans le SNC implique un recrutement rapide de cellules microgliales, la capacité de ces cellules microgliales ALK4/5⁺ à être recrutées a été évaluée. Ainsi, des expériences de

migration *in vitro* ont démontré que les cellules microgliales ALK4/5⁺ peuvent utiliser la voie ALK4/5 pour être attirées au point de la lésion (Figure 23). La caractérisation du ou des ligands de ce récepteur ALK4/5 a été entreprise pour mieux comprendre comment la lésion des connectifs permettrait le recrutement d'une sous-population microgliale ALK4/5⁺.

La recherche du ligand potentiel a démontré qu'il existe bien un membre de la famille TGF- β chez la sangsue (Figure 24 et 25). Ce ligand a été comparé avec tous les ligands probables pour un récepteur du type ALK4/5/7, notamment TGF- β 1/2/3, activine A, activine B, GDF1/3/5/8/11 et Nodal. Les résultats ont démontré que ce ligand est une molécule homologue du GDF8/11 de mammifères. Cette molécule présente une identité et une homologie plus importantes avec ces deux types de molécules issues de nombreux mammifères comme *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, etc. (32% d'identité et 53% d'homologie avec GDF8 humain ; 34% d'identité et 49% d'homologie avec GDF11 humain) en comparaison avec les autres ligands potentiels humains (identités : TGF- β 1 23%, TGF- β 2 23%, TGF- β 3 25%, activine A 26%, activine B 26%, GDF1 34%, GDF3 29%, GDF5 37% et Nodal 32%; homologies : TGF- β 1 41%, TGF- β 2 40%, TGF- β 3 41%, activine A 38%, activine B 43%, GDF1 45%, GDF3 43%, GDF5 46% et Nodal 46%) (Annexe 1). Même si certaines molécules montrent des pourcentages d'homologie et d'identité non négligeables, elles présentent un recouvrement de séquence très faible, telles que GDF1 29%, GDF5 31% et Nodal 27%. En outre, lorsque la forme mature de sangsue contenant uniquement le peptide bioactif est comparée avec les bases de données humaines, les premières molécules homologues sont bien GDF8 et GDF11 avec une homologie de 60% et 62% respectivement (Figure 25). En conséquence, les caractéristiques moléculaires permettent d'attribuer à ce ligand de sangsue une proximité avec GDF8/11. C'est pourquoi, nous l'avons nommé nGDF pour sa production dans le système nerveux.

Après l'identification de ce membre de la famille TGF- β , il a été possible de définir plus clairement l'identité du récepteur ALK4/5/7. Dans la littérature, ces récepteurs ALK4/5/7 sont capables de reconnaître des ligands tels que TGF- β 1, GDF8 (Myostatine), GDF11, nodal, activine A et activine B. Néanmoins, ALK7 est reconnu dans la littérature comme étant plus spécifiquement un récepteur de l'activine A/B et

du ligand nodal (Graham & Peng, 2006; Reissmann et al., 2001; Salazar et al., 2016). De plus, des études ont démontré que le récepteur ALK7 aurait comme ligand naturel préférentiel l'activine B, et qu'il aurait beaucoup moins d'affinité pour les autres ligands (Khalil et al., 2016; Tsuchida et al., 2004). De ce fait, en ayant identifié notre ligand comme une molécule homologue au GDF8 et GDF11, ces éléments nous ont permis de considérer le récepteur au TGF- β de type I caractérisé chez la sangsue comme un récepteur ALK4 ou ALK5, que nous avons nommé logiquement ALK4/5.

Une fois le récepteur ALK4/5 caractérisé ainsi que son ligand potentiel nGDF, notre attention s'est portée sur la fonction que pourrait avoir une telle signalisation entre les cellules microgliales et les neurones. Les résultats ont démontré que dans une étape précoce après la lésion axonale dans les connectifs, nGDF est produit par les neurones et libéré au niveau des axones lésés pour exercer une activité chimiotactique importante sur les cellules microgliales immédiatement après la lésion (15 minutes après réalisation de la lésion) (Figures 26-28). Il est important de rappeler que les expériences permettant l'étude du recrutement des cellules microgliales chez la sangsue sont réalisées *ex vivo* sur des fragments isolés de chaîne nerveuse maintenus en culture organotypique. Ainsi, dans une telle préparation, il est tout à fait possible d'exercer des lésions expérimentales en y adjoignant dans les tissus la perfusion de molécules régulant l'accumulation microgliale. En tirant parti de cette capacité naturelle, la perfusion de l'anticorps anti-ALK5 a permis de décrire l'effet de la neutralisation du récepteur exposé par les cellules microgliales ALK4/5⁺. Les résultats ont montré que ce recrutement dépendant du relargage de nGDF par les axones lésés, intervient lors de l'étape précoce de mobilisation de la microglie pendant les premières heures post-lésion uniquement (T 6h). Ensuite, il n'est plus utilisé dans les étapes tardives de l'accumulation même si l'on constate que les cellules microgliales sont toujours recrutées au niveau de la lésion (Figure 29). Ces résultats suggèrent que nGDF a un rôle dans l'étape précoce du recrutement, et que d'autres signaux chimiotactiques pourront prendre le relai pour maintenir l'accumulation des cellules microgliales, qui atteint un niveau maximum 24 heures après la lésion. Concernant les autres signaux chimiotactiques, il pourrait s'agir des différents facteurs chimiotactiques qui ont déjà été caractérisés chez la sangsue, tels que : C1q, IL-16 et

EMAPII, et qui interviennent dans le recrutement microglial (Croq et al., 2010; Le Marrec-Croq et al., 2014; Schikorski et al., 2009; Tahtouh et al., 2009, 2012). Ces trois facteurs n'ont pas été à ce jour étudiés les uns par rapport aux autres pour leur effet chronologique sur le recrutement de sous-populations microgliales à la lésion. Nous ne savons pas encore si ces facteurs chimiotactiques constituent des signaux impliqués à posteriori de l'intervention du nGDF voire même sous son influence. L'analyse de ces signaux est donc nécessaire pour avoir une idée chronologique des facteurs libérés aux points de la lésion capables d'attirer différentes sous-populations de cellules microgliales exerçant des fonctions spécifiques, peut-être différentes, tout au long de la réponse à la lésion des connectifs.

La molécule GDF8 (alias myostatine) est principalement connue dans les muscles comme facteur de croissance régulant de manière négative la masse musculaire (Pirruccello-Straub et al., 2018). La myostatine a été décrite pour être reconnue par des récepteurs kinase 4 de type activine (ALK4 ou ActRIB) ou ALK5 (T β RI), et induisant la phosphorylation de Smad2 / Smad3 (Rebbapragada, Benchabane, Wrana, Celeste, & Attisano, 2003). Le GDF11 est sécrété par les neurones nouvellement produits dans la moelle épinière en développement pour favoriser la progression temporelle de la neurogenèse (Y. Shi & Liu, 2011). La myostatine et GDF11 sont étroitement liés et sont également produits dans le cerveau des mammifères, pour leur rôle dans le contrôle négatif de la prolifération neuronale au travers des récepteurs de type I, ALK4/5 (J. Kim et al., 2005; Wu et al., 2003). De plus, une étude réalisée chez la drosophile a permis la caractérisation d'un homologue GDF8/11, appelé Myoglianin. Cette molécule a été décrite comme ayant un effet négatif sur la formation et l'activité des synapses neuromusculaires de manière dépendante de Smad2 (Augustin et al., 2017), confirmant ainsi un rôle négatif dans la prolifération neuronale comme décrit chez les mammifères. Les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent une libération précoce de nGDF par des neurones endommagés au niveau de la lésion axonale afin de recruter les cellules microgliales. En tenant compte de la littérature, le nGDF pourrait également exercer un effet autocrine et/ou paracrine sur les axones voisins en inhibant des mécanismes de croissance axonale et de formation de synapses dans un premier temps. Ce rôle n'a pas encore été étudié.

Ensuite, concernant la réponse plus tardive à la lésion, les résultats ont montré que le récepteur ALK4/5 est exposé, cette fois-ci, à la surface d'une population de neurones (T16h et T24h post-lésion). Le récepteur est en effet détecté dans quelques axones ALK4/5⁺ endommagés au niveau des tissus connectifs et également dans certains corps cellulaires neuronaux situés dans les ganglions (Figure 30) alors que les images de microscopie confirment que les cellules microgliales n'exposent plus le récepteur ALK4/5 si tardivement post-lésion. Ces résultats suggèrent ainsi que les neurones soient, à leur tour, réactifs à un ligand de type nGDF dans une étape tardive en réponse à la lésion. A ce stade, notre attention s'est portée sur deux objectifs : la compréhension du rôle de ces neurones ALK4/5⁺ et la compréhension de l'origine du ligand qui active les neurones.

Des expériences préliminaires *in vitro* de croissance neuritique sur des neurones de sangsue maintenus en culture primaire ont suggéré que la forme recombinante du TGF- β humain pourrait exercer un effet positif sur la différenciation de ces cellules (Figure 31). Ces résultats ont suggéré que la présence du récepteur ALK4/5 au niveau neuronal aurait un rôle neurotrophique. Une telle réactivité des neurones ALK4/5⁺ à un membre de la famille TGF- β a déjà été décrite dans la littérature, montrant notamment un impact positif sur la survie et la croissance neuritique chez les mammifères. Par exemple, la différenciation neuronale et la survie peuvent utiliser la voie ALK4 grâce à la reconnaissance de l'activine A (Suzuki, Kobayashi, Funatsu, Morita, & Ikekita, 2010). L'exposition neuronale d'ALK5 chez les mammifères a également été décrite dans des conditions physiologiques pour faciliter leur survie (Ishihara et al., 1994; Tomoda et al., 1996; Yi et al., 2010). L'exposition neuronale d'ALK5 a été démontrée comme ayant un rôle protégeant de la neurodégénérescence et de la mort cellulaire dans la maladie d'Alzheimer (Brionne et al., 2003; Tesseur & Wyss-Coray, 2006). De manière intéressante, si le récepteur ALK5 est génétiquement supprimé chez la souris adulte, il en résulte une diminution du nombre de ramifications dendritiques des neurones du nouveau-né, ce qui entraîne en cascade une altération de la mémoire (Y. He et al., 2014). Ces travaux montrent l'importance de la signalisation ALK5 en tant que régulateur des derniers stades de la neurogenèse de l'hippocampe chez l'adulte. Cependant, les voies par lesquelles ces neurones

peuvent être régulés restent à clarifier car les sources de ligands de la famille du TGF- β peuvent être multiples au cours du développement mais également au cours du vieillissement du système nerveux.

Chez notre modèle sangsue, à ce jour, l'unique membre de la famille TGF- β détecté dans le système nerveux est le nGDF. La question de son rôle neurotrophique potentiel dans une étape tardive après la lésion se pose donc. En parallèle, comme nous l'avons dit précédemment, d'autres molécules chimiotactiques interviennent pour attirer les cellules microgliales au site de lésion. Une voie d'étude complémentaire a porté sur la possibilité que nGDF agisse dans une boucle neuroprotective en réponse à la lésion, en ayant pour rôle précoce d'attirer les cellules microgliales ALK4/5⁺ à la lésion (nGDF d'origine neuronale) mais aussi, plus tardivement, en stimulant les neurones ALK4/5⁺ dans la production d'autres facteurs chimiotactiques, nécessaires au recrutement à plus long terme d'autres sous-populations microgliales à la lésion. Cette hypothèse repose sur l'état actuel de nos connaissances du neurodéveloppement des mammifères. Dans la littérature, une dépendance entre TGF- β et C1q a déjà été démontrée. Le C1q neuronal, tout comme l'autre facteur du complément C3, intervient dans le mécanisme d'élagage synaptique, important et indispensable au développement normal du SNC (Stevens et al., 2007). Ces facteurs du complément sont en effet exposés par les neurones pour agir, en tant que molécules chimioattractantes, sur le recrutement de sous-populations microgliales C1qR⁺ et C3R⁺. Ces cellules microgliales une fois attirées seront responsables de l'élimination par phagocytose des neurites taggués par les facteurs du complément, ce qui permettra l'édification normale et fonctionnelle des neurones à l'état adulte. Or, une étude récente a également montré que la signalisation TGF- β régule entre autre la production de C1q neuronal (Bialas & Stevens, 2013). En effet, un ou plusieurs membres de la famille TGF- β seraient produits par les astrocytes et dirigés vers les neurones via les récepteurs au TGF- β de type I (alias ALK5) et de type II. Ceci entraîne alors la production de C1q par les neurones décrite comme nécessaire pour recruter les cellules microgliales responsables de la phagocytose des neurites aberrants. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la production neuronale de *HmC1q* (*Hirudo medicinalis*), précédemment décrite pour le recrutement microglial chez la sangsue (Le

Marrec-Croq et al., 2014; Tahtouh et al., 2009, 2012), pourrait également chez la sangsue être placée sous l'influence de la signalisation TGF- β afin de recruter une sous-population microgliale au niveau des axones lésés et initier un dialogue neuroprotecteur chez l'adulte. C'est pourquoi, nous avons mené l'étude d'une possible corrélation entre les neurones ALK4/5⁺ et la production neuronale de C1q. Les résultats ont démontré que les neurones ALK4/5⁺ sont réactifs aux ligands de la famille TGF- β dans les ganglions et induisent une production neuronale de C1q (Figure 32). Rien n'indique toutefois que les quelques neurones ALK4/5⁺ soient les seuls neurones capables de produire *HmC1q*. En effet, les neurones ALK4/5⁺ activés pourraient propager indirectement les signaux d'activation de façon paracrine induisant ainsi la production d'*HmC1q* dans les neurones voisins. Cette question pourra être abordée dans des études ultérieures. Toutefois, il est intéressant de noter que le recrutement de la microglie dépendant de C1q, exercé sur les cellules microgliales C1qBP⁺, a été significativement affecté suite à une inhibition de la voie de signalisation ALK4/5 (Figure 33). Ces résultats corroborent l'importance tardive de la voie ALK4/5 agissant comme une boucle déterminante dans le dialogue neuroprotecteur entre la microglie et les neurones. A ce stade, l'unique membre de la famille TGF- β détecté dans le système nerveux est le nGDF. Afin de comprendre comment ces neurones ALK4/5⁺ peuvent être activés, notre étude s'est focalisée sur la compréhension de la source de nGDF dans une étape tardive de la réponse à la lésion. Les résultats montrent que les neurones traités avec du milieu conditionné par des cellules microgliales sont capables d'induire une augmentation des transcrits *hmc1q*, suggérant ainsi que le nGDF à ce stade doit provenir du sécrétome des cellules microgliales. De manière intéressante, cette induction est abrogée lorsque les neurones sont traités avec du milieu conditionné de cellules microgliales et en présence de l'inhibiteur de la voie ALK4/5, montrant ainsi clairement l'implication de la voie de signalisation ALK4/5 (Figure 34).

Alors que l'utilisation d'un anticorps polyclonal dirigé contre le peptide actif de la famille TGF- β n'a permis par western blot que la détection de nGDF dans les cellules microgliales 24h post-lésion (Figure 35), d'autres expériences d'hybridation *in situ* ont précisé que l'ARNm *ngdf* est spécifiquement et exclusivement présent 24 heures après la lésion dans la microglie ganglionnaire (Figure 36). Les analyses

d'immunofluorescence confirment la présence de la protéine nGDF dans les espaces intercellulaires ganglionnaires (Figure 37). Les résultats combinés suggèrent que certaines cellules microgliales des ganglions libèrent du nGDF capable d'interagir avec les corps cellulaires neuronaux pour entre autre réguler la production fine de *HmC1q*. Ce ligand unique du récepteur ALK4/5 est donc produit dans la microglie ganglionnaire et utilisé vers les neurones dans l'étape tardive de la réponse à la lésion. La présence de ligatures empêchant toute relation entre les connectifs et les ganglions a conduit à l'inhibition de la libération de nGDF dans les ganglions. Nous suggérons ainsi que la zone de lésion axonale implique une communication distante entre les régions des connectifs et des ganglions par l'intermédiaire de médiateurs diffusibles pouvant propager des signaux d'alerte depuis les connectifs lésés vers les ganglions nerveux adjacents, contenant par ailleurs les corps cellulaires des neurones lésés et les microglies ganglionnaires. Des processus moléculaires reposant par exemple sur l'ATP ou encore le monoxyde d'azote (NO) ont été décrit dans la mobilisation microgliale sur des distances importantes (Arafah et al., 2013; A. Chen et al., 2000; Duan et al., 2009). Un mécanisme possible est que les axones lésés informent la microglie des connectifs tandis que la microglie ganglionnaire activée à distance par la lésion communique avec les corps cellulaires neuronaux eux-mêmes. Le signal d'induction provenant de la lésion par lequel le nGDF spécifique de la microglie ganglionnaire activerait la production neuronale de *HmC1q* reste à élucider. De la même façon, il reste à mieux comprendre également l'influence de nGDF sur les autres signaux chimiotactiques. Des expériences préliminaires suggèrent que le nGDF puisse avoir une influence sur les niveaux de transcrits *emap11* et *il-16* dans les neurones (Figure 38). Par conséquent, même si ces corrélations semblent très préliminaires, le nGDF pourrait être un signal maître guidant une mobilisation séquentielle correcte tout au long de l'accumulation des cellules microgliales qui, correctement effectuée, peut conduire à la réparation fonctionnelle du système nerveux central dans la sangsue.

De même, des analyses moléculaires comparatives entre cellules microgliales ganglionnaires et cellules microgliales des connectifs seraient très intéressantes et permettraient de comprendre le rôle spécifique de ces deux sous-populations respectives. Cela aiderait notamment à déchiffrer la réponse suite à la lésion, non

seulement de manière chronologique, mais aussi dépendamment de leur proximité avec soit les corps neuronaux, soit les axones lésés. Des résultats préliminaires de signatures protéiques comparatives suggèrent en effet que la position de ces cellules et leur environnement spécifique puissent conditionner leurs produits et leurs fonctions (Figure 45). Cette différence entre les deux sous-populations semble normale depuis que des études récentes ont montré que les signaux spécifiques du microenvironnement dirigent directement le développement microglial (Gosselin et al., 2014, 2017; Rahimian et al., 2018; Thion et al., 2018).

Une seconde approche expérimentale a consisté à examiner dans leur globalité les signatures protéiques mises en jeu dans la zone de lésion axonale au cours du temps. Puisque les données antérieures ont démontré que nGDF contribue au recrutement précoce de la sous-population des cellules microgliales dans les connectifs, il est apparu pertinent d'étudier le profil protéomique de la lésion dans cette fenêtre temporelle (T0 – T24h). Les analyses ont été réalisées au point de la lésion par LESA, correspondant à l'analyse des protéines d'un environnement tissulaire par micro-extraction liquide (Figures 39). Cette technique nous a permis de collecter et d'étudier les protéines libérées au point de la lésion à différents temps post lésion (T0, T6h et T24h). De plus, pour pouvoir étudier non seulement le profil protéomique au cours du temps, mais aussi afin de suivre le profil de manière TGF- β dépendant, les chaînes nerveuses lésées ont été traitées avec l'inhibiteur SB431542, un inhibiteur spécifique de la voie ALK4/5. Les résultats ont montré qu'une part importante de la réponse à la lésion est effectivement dépendante de la voie de signalisation ALK4/5 (Figure 40 et 41). Par ailleurs, la liste des protéines exclusives et surreprésentées présente une diminution des protéines associées à la voie TGF- β après l'inhibition de la voie de signalisation ALK4/5, montrant ainsi l'efficacité du traitement par l'inhibiteur. De manière intéressante dans la condition T0 inhibiteur, la protéine Ski est détectée. Or elle est considérée comme un des régulateurs négatifs importants de la voie de signalisation TGF- β , en tant que corépresseur des facteurs Smads (Wrana, 2013).

Les analyses globales des signatures protéiques spécifiques et surreprésentées dans chaque condition ont permis de comparer les processus fonctionnels, dépendamment de la voie de signalisation ALK4/5, impliqués dans la réponse à la lésion (Figure 42 et

43). Parmi les protéines exclusives ou surreprésentées à T0 après l'inhibition d'ALK4/5, des molécules connues pour être impliquées dans les maladies neurodégénératives sont détectées, incluant par exemple la succinate-CoA ligase (SUCLG1), le complexe NADH déshydrogénase (NDUFA10, NDUFS2), le cytochrome c (CYCS), la protéine de type oxoglutarate déshydrogénase (OGDHL), les sous-unités de l'ATP synthase (ATP5J2, ATP5A1) et la phosphoglycérate kinase 2 (PGK2). Il est intéressant de noter que ces protéines associées à l'hypoxie sont liées à la microglie pro-inflammatoire et peuvent être impliquées dans les maladies d'Alzheimer et de Huntington (Zhang et al., 2017). De ce fait, les résultats après inhibition d'ALK4/5 suggèrent le passage d'un profil naturellement neuroprotecteur à un profil semblable à celui observé dans les maladies neurodégénératives. Au stade tardif, soit 24h après traitement par l'inhibiteur, seules 3 protéines spécifiques sont détectées (SSUH2, TPM2, PPP3CB), parmi lesquelles la SSUH2 est surexprimée dans les problèmes neurologiques (X. Chen, Long, Cai, Chen, & Chen, 2018). En outre, ces résultats établissent le nombre de molécules pouvant être affectées par l'inhibition de la voie ALK4/5 au cours du temps. Les résultats montrent que l'effet de l'inhibiteur est moins important dans l'étape tardive au point de la lésion. Il est intéressant de noter que NTRK2 qui est connu pour se lier au facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et à la neurotrophine-4 (NTF4) est surreprésenté dans le contrôle sans inhibiteur d'ALK4/5, ce qui confirme ainsi l'implication de la voie ALK4/5 dans le processus de survie neuronale et de croissance des neurites.

D'autres analyses ont été réalisées en comparant les signatures des protéines exclusives et surreprésentées entre les différents temps post-lésion, visant à trouver les protéines impliquées dans différents processus biologiques au point de la lésion. Les résultats montrent l'identification précoce de la voie de signalisation médiée par CXCR4, très importante à T0 et T6h mais absente à T24h après la lésion. Comme l'étude a été réalisée au point de la lésion, il est possible que la majorité des résultats correspondent à la réponse des cellules microgliales accumulées à la lésion. Néanmoins, on ne peut pas certifier que cette analyse décrive strictement et exclusivement les événements microgliaux. Cependant, il est démontré que CXCR4 est produit par la microglie et présente un rôle dans la régulation de la colonisation des

cellules microgliales sous l'influence de CXCL12 (Arnò et al., 2014). Au cours du développement cortical, l'interaction entre les neurones et la microglie est effectuée notamment par l'intermédiaire de CXCL12/CXCR4, et est fondamentale pour la colonisation de cette région du cerveau par la microglie. Cette activation précoce de la microglie est également décrite comme une signature des cellules microgliales au stade embryonnaire, importante dans la distribution de la microglie au cerveau (Thion et al., 2018). Enfin, la signalisation CXCR4 protégerait en premier lieu les neurones de la mort cellulaire, ce qui est crucial pour maintenir l'intégrité du SNC suite à une lésion dans laquelle l'endommagement ou la perte neuronal sont typiques de nombreuses affections neurodégénératives et neuro-inflammatoires (Khan et al., 2008). Enfin, cette voie CXCR4 semble aussi très importante pour la migration de cellules microgliales à la lésion chez la sangsue. Puisqu'elle est régulée négativement lors du traitement avec l'inhibiteur du récepteur ALK4/5 entre T0 et T6h post-lésion, son implication est plus que probable dans la réponse précoce à la lésion. Ainsi, les résultats suggèrent que la réponse à la lésion implique un environnement neuroprotecteur facilité par le recrutement de cellules microgliales spécifiques et en partie dépendant de la voie de signalisation ALK4/5.

Il est également intéressant de noter qu'à l'inverse, la signalisation par le récepteur Trk induit par des facteurs neurotrophiques, semble décrire une réponse plus importante dans la phase tardive de réponse à la lésion (T24h post-lésion) par rapport aux étapes précédentes (T0 et T6h). De la même façon que précédemment, le traitement avec l'inhibiteur de la voie ALK4/5 montre une diminution importante de protéines impliquées dans la signalisation du récepteur Trk, montrant ainsi que cette voie est en partie dépendante de la signalisation ALK4/5. La signalisation du récepteur Trk a été décrite récemment comme partie des récepteurs de surface cellulaire importants pour la régénération des axones dans le SNC. L'expression neuronale des récepteurs trk tels que trkB s'est révélée nécessaire à une amélioration significative de la croissance et une régénération des axones blessés chez les mammifères (Cheah & Andrews, 2016).

Ces résultats nous permettent d'établir une hypothèse sur la chronologie de certaines fonctions majeures qui débuteraient de manière précoce en facilitant le recrutement de sous-types microgliaux pour assurer une protection du point de la lésion

(extrémités axonales), suivies par une régénération des axones et une synaptogenèse. Par exemple, comme le révèlent la diminution voire même la disparition des protéines impliquées dans le guidage axonal après inhibition significative de la voie ALK4/5, le blocage de cette signalisation compromet très sévèrement les propriétés de régénération nerveuse après lésion axonale. En outre, l'analyse protéomique de la lésion montre dans la condition témoin des protéines impliquées dans des événements apoptotiques, comme il est possible d'en observer typiquement dans les cas de lésion. Ces signatures moléculaires sont significativement plus abondantes suite à l'inhibition d'ALK4/5 suggérant là encore l'implication de la voie ALK4/5 dans le contrôle de la mort cellulaire après une lésion.

Un autre processus fonctionnel remarquable est mis en évidence par la détection de molécules impliquées dans la construction des vésicules extracellulaires (VEs), telles que les exosomes, au niveau de la lésion (Figure 44). L'abondance des protéines impliquées dans les composants vésiculaires, jusqu'à 59% pour la condition T6h, suggère que les VEs soient produites et accumulées au point de la lésion. Ce processus semble être peu affecté par l'inhibition d'ALK4/5 puisqu'une très légère diminution de ce processus est observée après inhibition. Dans toutes les cas, ces résultats suggèrent que les VEs peuvent être libérées suite à une lésion par les neurones et/ou les cellules microgliales recrutées tout au long de la réponse à la lésion (Francesco Drago et al., 2017; Murgoci et al., 2018; Prada et al., 2018). La réponse à la lésion axonale médiée par les VEs semble être un mécanisme important et privilégié du dialogue entre les cellules microgliales et les neurones conduisant à la réparation nerveuse de la sangsue. La compréhension de ces mécanismes médiés par les VEs est cruciale pour mieux comprendre les événements neuroprotecteurs influencés par les VEs et menant à la régénération nerveuse.

Depuis quelques années, l'étude des vésicules extracellulaires représente un enjeu important en raison de leur présence dans les liquides biologiques, notamment l'urine, la salive, le plasma et le liquide céphalorachidien (S. H. Kim, Bianco, Shufesky, Morelli, & Robbins, 2007; Lee et al., 2016; Michael et al., 2010; Z. Wang, Hill, Luther, Hachey, & Schey, 2012). Les VEs sont produites par presque tous les types de cellules et organismes. C'est pourquoi, elles font l'objet d'une attention particulière dans le but

de décoder leur implication dans la communication intercellulaire. Cela permettra de mieux comprendre leur capacité à informer/affecter les cellules receveuses dans des conditions physiologiques ou pathologiques. Les deux types de VEs, exosomes et microvésicules (ectosomes), partagent des mécanismes moléculaires dans leur biogenèse même s'ils ne suivent pas les mêmes voies de fabrication (Lötvall et al., 2014; van Niel et al., 2018). Une fois formées, ces VEs partagent aussi des molécules biologiquement actives parmi les protéines, lipides et acides nucléiques (Haraszti et al., 2016; Kreimer et al., 2015; Valadi et al., 2007).

Dans le système nerveux central, le dialogue entre les cellules microgliales et les neurones est crucial pour l'intégrité du cerveau. Ces cellules peuvent communiquer en libérant et en recevant des vésicules extracellulaires, ce qui permet une régulation synchronisée sur de longues distances (Budnik, Ruiz-Cañada, & Wendler, 2016; Krämer-Albers & Hill, 2016; Lai & Breakefield, 2012; Rajendran et al., 2014). Il a été démontré que les cellules microgliales ont un rôle crucial dans cette communication médiée par VEs (Rosa C. Paolicelli, Bergamini, & Rajendran, 2018). C'est pourquoi, la communication médiée par les VEs d'origine microgliale a déjà suscité l'intérêt de différentes études au laboratoire, notamment orientées sur leur contenu en protéines et miRNA, et leur rôle potentiel dans le dialogue neuroprotecteur chez la sangsue. Les premières observations dans des co-cultures entre neurones et cellules microgliales ont montré l'abondance de nanoparticules en interaction avec les axones (Figure 46). Ce résultat a permis d'évoquer la possible production de VEs chez la sangsue, lesquelles ont été caractérisées ensuite par immunomarquage avec Alix, un marqueur spécifique des VEs (Mathivanan & Simpson, 2009; Théry et al., 2001). Ces VEs immunopositives pour Alix ont été détectées au point de la lésion des connectifs à l'endroit même de l'accumulation des cellules microgliales et dans les ganglions au niveau des espaces interneuronaux, là où se trouvent les cellules microgliales ganglionnaires. L'observation des VEs par microscopie électronique a confirmé la production des VEs par la microglie (Figure 47). Des expériences utilisant un anticorps dirigé contre un marqueur spécifique des cellules gliales, la Gliarine (Y. X. Xu et al., 1999), a confirmé que les VEs d'origine microgliale interagissent de manière très étroite avec les neurones *in vitro* (Figure 48). Les cellules microgliales chez la sangsue

produisent un grand nombre de VEs *in vitro*, ce qui suggère une importante capacité de dialogue avec les cellules voisines, y compris les neurones. Le travail de Tanina Arab a démontré que les VEs d'origine microgliale ont une capacité à induire la croissance neuritique des neurones de sangsue (Figure 49). C'est dans ce contexte et à la suite des résultats d'analyses protéomiques de la lésion montrant des signatures VEs abondantes que nous avons décidé d'amorcer l'étude du dialogue entre les cellules microgliales et les neurones chez la sangsue, médié par des VEs et dépendamment de la voie de signalisation ALK4/5. Les résultats montrent la présence de VEs nGDF⁺ d'origine microgliale dans une étape tardive de la réponse à la lésion (Figure 36, 37, 50 et 51). Pour étudier l'importance de ces VEs microgliales dans le rôle neurotrophique appliqué sur les neurones de sangsue, des expériences de croissance neuritique *in vitro* ont été réalisées. Pour information, les neurones chez la sangsue ont été séparés en sous-groupes selon leur taille. Les neurones de petite taille montrent plus de facilité à être conservés en culture primaire, car plus adhérents, et présentent une vitesse de croissance plus importante. C'est pourquoi, nous avons réalisé nos expériences en sélectionnant les neurones compris entre 6 et 20 µm. Les résultats ont confirmé qu'une partie de cette capacité *in vitro* est dépendante de la signalisation ALK4/5 (Figure 52). Ainsi, nGDF pourrait avoir un rôle de médiateur de la croissance neuritique *in vitro*. Il peut agir non seulement de manière libre (Figure 31) mais aussi par l'intermédiaire de VEs d'origine microgliale (Figure 52). Étant donné le fait que les VEs représentent une approche diagnostique et thérapeutique innovante, les données visant à déchiffrer ces VEs chez notre modèle sangsue contribueraient à mieux comprendre les dialogues microglie/neurones et à utiliser les VEs comme une stratégie expérimentale permettant d'impacter les pathogenèses du SNC.

Nous ne savons pas encore si nGDF d'origine neuronale exerce un effet autocrine et/ou paracrine sur les axones voisins en inhibant la croissance axonale et la formation de synapse dans l'étape précoce de la réponse à la lésion. En revanche, les résultats montrent l'importance de la voie ALK4/5 intervenant dans la mobilisation séquentielle de l'accumulation de cellules microgliales. Les résultats montrent que nGDF recrute rapidement une première sous-population de cellules microgliales au point de la lésion. Ces cellules engagent un dialogue déterminant avec les extrémités axonales

lésées qu'il nous faut continuer à comprendre. Plus tard au cours de la réponse à la lésion, nGDF d'origine microgliale induit la croissance neuritique *in vitro* mais stimule également la production de HmC1q par les neurones permettant la libération de ce facteur aux extrémités axonales afin d'autres cellules microgliales au point de la lésion. Ce travail a permis en conséquence de mieux comprendre l'organisation des évènements moléculaires mis en jeu dans le dialogue initié entre microglies et neurones dans la réponse chronologique à la lésion du système nerveux.

Bien que les cellules microgliales chez les mammifères soient organisées dans un environnement cellulaire bien plus complexe et moins accessible, leur étude représente un élément essentiel à la compréhension des pathologies humaines du système nerveux. Cependant, l'étude des microglies dans leur environnement propre représente un défi important. Elles présentent en effet une multitude de réponses fines et adaptées aux changements de leur microenvironnement (Lavin et al., 2014). Dans ce contexte, l'analyse de populations microgliales chez des organismes plus simples dans l'organisation de leur SNC apportera un éclairage nouveau sur les fonctions des cellules microgliales humaines. Toutes les études réalisées chez d'autres modèles, tels que le nématode *Caenorhabditis elegans*, le poisson zèbre ou les rongeurs, sont nécessaires pour définir fondamentalement les spécificités des cellules microgliales ainsi que leurs fonctions.

Par ailleurs, j'ai eu l'opportunité de participer à une collaboration avec le Dr. Daniel Erny, de l'Institut de Neuropathologie de l'université de Freiburg dirigé par le Dr. Marco Prinz. Notre objectif a consisté à comparer les cellules microgliales chez 8 modèles animaux de microglie dont faisait partie la sangsue *Hirudo medicinalis*. Grâce aux expériences que nous avons réalisées à Freiburg, nous avons confirmé par tri cellulaire la présence relative des marqueurs de surface CD11b et CD45 sur les cellules microgliales de sangsue. La reconstruction tridimensionnelle, réalisée à l'aide d'un marquage Iba-1, a également montré une morphologie des cellules microgliales de sangsue similaire à celle des mammifères, en gardant à l'esprit que la microglie de sangsue est un peu moins ramifiée mais bien plus abondante dans la chaîne nerveuse de cet organisme par rapport à la densité observée dans les tissus de mammifères. Cette différence en nombre de cellules analysées repose probablement aussi sur la

plus grande aisance à collecter les cellules chez la sangsue comparée aux étapes de dissociation et séparation nécessaires chez les mammifères. La publication commune de ces travaux est en cours de réflexion.

Les modèles invertébrés semblent bien placés pour faire progresser notre compréhension des bases moléculaires de la biologie microgliale dans les années à venir en raison de l'accessibilité des cellules du système nerveux. Cet apport a déjà eu lieu concernant une partie de nos connaissances sur les propriétés fondamentales de la communication neuronale (Guillery, 2005). Chez la sangsue, l'accessibilité des cellules nerveuses a permis d'observer la capacité de repousse axonale et de synaptogenèse naturelles, offrant une occasion rare d'étudier les étapes moléculaires et cellulaires du processus de survie neuronale (Blackshaw, Babington, Emes, Malek, & Wang, 2004; von Bernhardt & Muller, 1995; W.-Z. Wang, Emes, Christoffers, Verrall, & Blackshaw, 2005). En effet, malgré la distance évolutive qui sépare la sangsue *Hirudo Medicinalis* et les mammifères, les échelles moléculaire et cellulaire ainsi que la physiologie des neurones sont très proches. De mon point de vue, il est préférable de préserver la sangsue et d'autres modèles alternatifs en tant qu'outils complémentaires pouvant être utiles à la compréhension des mécanismes biologiques fondamentaux permettant l'intégrité du SNC. Je pense que les études effectuées, comme celle-ci, à partir de modèles complémentaires pourraient aider à la compréhension des dialogues cellulaires dans le cerveau des mammifères. L'apport de la sangsue en tant que modèle a déjà contribué à la découverte de la microglie par del Rio-Hortega. Il pourrait également par des expériences *in vivo* sur ses cellules apporter davantage de données fondamentales dans la réponse de la microglie à une lésion neuronale.

BIBLIOGRAPHIE

- Abeyasinghe, H., Phillips, E., Chin-Cheng, H., Beart, P., Roulston, C., Abeyasinghe, H. C. S., ... Roulston, C. L. (2016). Modulating Astrocyte Transition after Stroke to Promote Brain Rescue and Functional Recovery: Emerging Targets Include Rho Kinase. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 288. <https://doi.org/10.3390/ijms17030288>
- Abutbul, S., Shapiro, J., Szaingurten-Solodkin, I., Levy, N., Carmy, Y., Baron, R., ... Monsonego, A. (2012). TGF- β signaling through SMAD2/3 induces the quiescent microglial phenotype within the CNS environment. *Glia*, 60(7), 1160–1171. <https://doi.org/10.1002/glia.22343>
- Aguzzi, A., Barres, B. A., & Bennett, M. L. (2013). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science (New York, N.Y.)*, 339(6116), 156–161. <https://doi.org/10.1126/science.1227901>
- Aloisi, F., Ria, F., Adorini, L., Aloisi, F., Ria, F., & Adorini, L. (2000). Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunology Today*, 21(3), 141–147. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(99\)01512-1](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(99)01512-1)
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Antonucci, F., Turola, E., Riganti, L., Caleo, M., Gabrielli, M., Perrotta, C., ... Verderio, C. (2012). Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *The EMBO Journal*, 31(5), 1231–1240. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.489>
- Arafah, K., Croix, D., Vizioli, J., Desmons, A., Fournier, I., & Salzet, M. (2013). Involvement of nitric oxide through endocannabinoids release in microglia activation during the course of CNS regeneration in the medicinal leech. *GLIA*. <https://doi.org/10.1002/glia.22462>
- Arcuri, C., Mecca, C., Bianchi, R., Giambanco, I., & Donato, R. (2017). The Pathophysiological Role of Microglia in Dynamic Surveillance, Phagocytosis and Structural Remodeling of the Developing CNS. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 191. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00191>
- Arnò, B., Grassivaro, F., Rossi, C., Bergamaschi, A., Castiglioni, V., Furlan, R., ... Muzio, L. (2014). Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. *Nature Communications*, 5(1), 5611. <https://doi.org/10.1038/ncomms6611>
- Attaai, A., Neidert, N., von Ehr, A., Potru, P. S., Zöllner, T., & Spittau, B. (2018). Postnatal maturation of microglia is associated with alternative activation and activated

- TGF β signaling. *Glia*, 66(8), 1695–1708. <https://doi.org/10.1002/glia.23332>
- Attisano, L., Wrana, J. L., Montalvo, E., & Massagué, J. (1996). Activation of signalling by the activin receptor complex. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 1066–1073.
- Augustin, H., McGourty, K., Steinert, J. R., Cochemé, H. M., Adcott, J., Cabecinha, M., ... Partridge, L. (2017). Myostatin-like proteins regulate synaptic function and neuronal morphology. *Development*, 144(13), 2445–2455. <https://doi.org/10.1242/dev.152975>
- Baylor, D. A., & Nicholls, J. G. (1971a). Patterns of regeneration between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Nature*, 232(5308), 268–270.
- Baylor, D. A., & Nicholls, J. G. (1971b). Patterns of regeneration between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Nature*, 232(5308), 268–270. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4328425>
- Bennett, M. L., Bennett, F. C., Liddelow, S. A., Ajami, B., Zamanian, J. L., Fernhoff, N. B., ... Barres, B. A. (2016). New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12), E1738-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525528113>
- Bialas, A. R., & Stevens, B. (2013). TGF- β signaling regulates neuronal C1q expression and developmental synaptic refinement. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1773–1782. <https://doi.org/10.1038/nn.3560>
- Bignami, A., Eng, L. F., Dahl, D., & Uyeda, C. T. (1972). Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. *Brain Research*, 43(2), 429–435. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4559710>
- Blackshaw, S., Babington, E., Emes, R., Malek, J., & Wang, W.-Z. (2004). Identifying genes for neuron survival and axon outgrowth in *Hirudo medicinalis*. *Journal of Anatomy*, 204(1), 13. <https://doi.org/10.1111/J.1469-7580.2004.00260.X>
- Boesen, C. C., Radaev, S., Motyka, S. A., Patamawenu, A., & Sun, P. D. (2002). The 1.1 Å crystal structure of human TGF-beta type II receptor ligand binding domain. *Structure (London, England : 1993)*, 10(7), 913–919.
- Bohlen, C. J., Bennett, F. C., Tucker, A. F., Collins, H. Y., Mulinyawe, S. B., & Barres, B. A. (2017). Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. *Neuron*, 94(4), 759–773.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.043>
- Boidin-Wichlacz, C., Vergote, D., Slomianny, C., Jouy, N., Salzet, M., & Tasiemski, A. (2012). Morphological and functional characterization of leech circulating blood cells: role in immunity and neural repair. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(10), 1717–1731. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0897-x>

- Boutet, E., Lieberherr, D., Tognolli, M., Schneider, M., Bansal, P., Bridge, A. J., ... Xenarios, I. (2016). UniProtKB/Swiss-Prot, the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View (pp. 23–54). Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3167-5_2
- Bradl, M., & Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 37. <https://doi.org/10.1007/S00401-009-0601-5>
- Brionne, T. C., Tesseur, I., Masliah, E., & Wyss-Coray, T. (2003). Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron*, *40*(6), 1133–1145.
- Bruttger, J., Karram, K., Wörtge, S., Regen, T., Marini, F., Hoppmann, N., ... Waisman, A. (2015). Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity*, *43*(1), 92–106. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.06.012>
- Budnik, V., Ruiz-Cañada, C., & Wendler, F. (2016). Extracellular vesicles round off communication in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, *17*(3), 160–172. <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.29>
- Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., ... Weiner, H. L. (2014). Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature Neuroscience*, *17*(1), 131–143. <https://doi.org/10.1038/nn.3599>
- Buttgereit, A., Lelios, I., Yu, X., Vrohligs, M., Krakoski, N. R., Gautier, E. L., ... Greter, M. (2016). Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function. *Nature Immunology*, *17*(12), 1397–1406. <https://doi.org/10.1038/ni.3585>
- Casano, A. M., Albert, M., & Peri, F. (2016). Developmental Apoptosis Mediates Entry and Positioning of Microglia in the Zebrafish Brain. *Cell Reports*, *16*(4), 897–906. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.033>
- Cheah, M., & Andrews, M. (2016). Targeting cell surface receptors for axon regeneration in the central nervous system. *Neural Regeneration Research*, *11*(12), 1884. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.197079>
- Chen, A., Kumar, S. M., Sahley, C. L., & Muller, K. J. (2000). Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the leech CNS. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *20*(3), 1036–1043. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10648709>
- Chen, W., & ten Dijke, P. (2016). Immunoregulation by members of the TGF β superfamily. *Nature Reviews Immunology*, *16*(12), 723–740. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.112>
- Chen, X., Long, F., Cai, B., Chen, X., & Chen, G. (2018). A novel relationship for

- schizophrenia, bipolar and major depressive disorder Part 3: Evidence from chromosome 3 high density association screen. *Journal of Comparative Neurology*, 526(1), 59–79. <https://doi.org/10.1002/cne.24311>
- Chiu, I. M., Morimoto, E. T. A., Goodarzi, H., Liao, J. T., O’Keeffe, S., Phatnani, H. P., ... Maniatis, T. (2013). A Neurodegeneration-Specific Gene-Expression Signature of Acutely Isolated Microglia from an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *Cell Reports*, 4(2), 385–401. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.018>
- Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015). Ectosomes and exosomes : shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*, 25(6), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.01.004>
- Coggeshall, R. E., & Fawcett, D. W. (1964). The Fine Structure of the Central Nervous System of the Leech, *Hirudo Medicinalis*. *Journal of Neurophysiology*, 27(2), 229–289. <https://doi.org/10.1152/jn.1964.27.2.229>
- Cohen, M., Matcovitch, O., David, E., Barnett-Itzhaki, Z., Keren-Shaul, H., Blecher-Gonen, R., ... Schwartz, M. (2014). Chronic exposure to TGF β 1 regulates myeloid cell inflammatory response in an IRF7-dependent manner. *The EMBO Journal*, 33(24), 2906–2921. <https://doi.org/10.15252/embj.201489293>
- Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol>
- Connors, B. W., & Long, M. A. (2004). ELECTRICAL SYNAPSES IN THE MAMMALIAN BRAIN. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 393–418. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131128>
- Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R. A., Olsen, J. V., & Mann, M. (2011). Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of Proteome Research*, 10(4), 1794–1805. <https://doi.org/10.1021/pr101065j>
- Croq, F., Vizioli, J., Tuzova, M., Tahtouh, M., Sautiere, P.-E., Van Camp, C., ... Lefebvre, C. (2010). A homologous form of human interleukin 16 is implicated in microglia recruitment following nervous system injury in leech *Hirudo medicinalis*. *Glia*, 58(14), 1649–1662. <https://doi.org/10.1002/glia.21036>
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323), 562–566. <https://doi.org/10.1038/nature09513>
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V, Zuo, Y., Jung, S., ... Gan, W.-B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752–758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- Demetrius, L. A., Magistretti, P. J., & Pellerin, L. (2014). Alzheimer’s disease: the

- amyloid hypothesis and the Inverse Warburg effect. *Frontiers in Physiology*, 5, 522. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00522>
- Drago, F., Lombardi, M., Prada, I., Gabrielli, M., Joshi, P., Cojoc, D., ... Verderio, C. (2017). ATP Modifies the Proteome of Extracellular Vesicles Released by Microglia and Influences Their Action on Astrocytes. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 910. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00910>
- Drago, F., Sautière, P.-E., Le Marrec-Croq, F., Accorsi, A., Van Camp, C., Salzet, M., ... Vizioli, J. (2014). Microglia of medicinal leech (*Hirudo medicinalis*) express a specific activation marker homologous to vertebrate ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1/alias aif-1). *Developmental Neurobiology*, 74(10). <https://doi.org/10.1002/dneu.22179>
- Duan, Y., Sahley, C. L., & Muller, K. J. (2009). ATP and NO dually control migration of microglia to nerve lesions. *Developmental Neurobiology*, 69(1), 60–72. <https://doi.org/10.1002/dneu.20689>
- Dykes, I. M., Freeman, F. M., Bacon, J. P., & Davies, J. A. (2004). Molecular basis of gap junctional communication in the CNS of the leech *Hirudo medicinalis*. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(4), 886–894. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3676-03.2004>
- Eggen, B. J. L., Raj, D., Hanisch, U.-K., & Boddeke, H. W. G. M. (2013). Microglial Phenotype and Adaptation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 8(4), 807–823. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9490-4>
- Elliot, E. J., & Muller, K. J. (1982). Synapses between neurons regenerate accurately after destruction of ensheathing glial cells in the leech. *Science (New York, N.Y.)*, 215(4537), 1260–1262.
- Elmore, M. R. P., Najafi, A. R., Koike, M. A., Dagher, N. N., Spangenberg, E. E., Rice, R. A., ... Green, K. N. (2014). Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*, 82(2), 380–397. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.02.040>
- Endo, F., Komine, O., Fujimori-Tonou, N., Katsuno, M., Jin, S., Watanabe, S., ... Yamanaka, K. (2015). Astrocyte-Derived TGF- β 1 Accelerates Disease Progression in ALS Mice by Interfering with the Neuroprotective Functions of Microglia and T Cells. *Cell Reports*, 11(4), 592–604. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.053>
- Erny, D., Hrabě de Angelis, A. L., Jaitin, D., Wieghofer, P., Staszewski, O., David, E., ... Prinz, M. (2015). Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nature Neuroscience*, 18(7), 965–977. <https://doi.org/10.1038/nn.4030>
- Färber, K., Cheung, G., Mitchell, D., Wallis, R., Weihe, E., Schwaeble, W., & Kettenmann, H. (2009). C1q, the recognition subcomponent of the classical pathway of complement, drives microglial activation. *Journal of Neuroscience*

Research, 87(3), 644–652. <https://doi.org/10.1002/jnr.21875>

Feng, X.-H., & Derynck, R. (1997). A kinase subdomain of transforming growth factor- β (TGF- β) type I receptor determines the TGF- β intracellular signaling specificity. *The EMBO Journal*, 16(13), 3912–3923. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.13.3912>

Fitch, M. T., & Silver, J. (2008). CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Experimental Neurology*, 209(2), 294–301. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.05.014>

Frühbeis, C., Fröhlich, D., & Krämer-Albers, E.-M. (2012). Emerging roles of exosomes in neuron-glia communication. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00119>

Galea, I., Bechmann, I., & Perry, V. H. (2007). What is immune privilege (not)? *Trends in Immunology*, 28(1), 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.it.2006.11.004>

Gao, W. Q., & Macagno, E. R. (1988). Axon extension and retraction by leech neurons: severing early projections to peripheral targets prevents normal retraction of other projections. *Neuron*, 1(4), 269–277.

Geoffroy, C. (2011). Effet des protéines de la myéline sur la régénération axonale et le bourgeonnement. *Médecine/sciences*, 27(2), 132–135. <https://doi.org/10.1051/medsci/2011272132>

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., ... Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>

Ginhoux, F., & Williams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, 44(3), 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>

Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), a020537. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020537>

Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordão, M. J. C., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., ... Prinz, M. (2016). Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nature Immunology*, 17(7), 797–805. <https://doi.org/10.1038/ni.3423>

Gomez-Nicola, D., & Perry, V. H. (2015). Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 21(2), 169–184. <https://doi.org/10.1177/1073858414530512>

Gomez Perdiguero, E., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., ...

- Rodewald, H.-R. (2015). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, *518*(7540), 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature13989>
- Gordon, D., & Green, P. (2013). Consed: a graphical editor for next-generation sequencing. *Bioinformatics*, *29*(22), 2936–2937. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt515>
- Gosselin, D., Link, V. M., Romanoski, C. E., Fonseca, G. J., Eichenfield, D. Z., Spann, N. J., ... Glass, C. K. (2014). Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell*, *159*(6), 1327–1340. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.023>
- Gosselin, D., Skola, D., Coufal, N. G., Holtman, I. R., Schlachetzki, J. C. M., Sajti, E., ... Glass, C. K. (2017). An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science (New York, N.Y.)*, *356*(6344), eaal3222. <https://doi.org/10.1126/science.aal3222>
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M. H., Clohisey, S., Baillie, J. K., Stevens, M. P., ... McColl, B. W. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nature Neuroscience*, *19*(3), 504–516. <https://doi.org/10.1038/nn.4222>
- Graham, H., & Peng, C. (2006). Activin receptor-like kinases: structure, function and clinical implications. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, *6*(1), 45–58.
- Greter, M. (2016). Family ties among CNS macrophages. *Nature Immunology*, *17*(7), 742–743. <https://doi.org/10.1038/ni.3490>
- Guillery, R. W. (2005). Observations of synaptic structures: origins of the neuron doctrine and its current status. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *360*(1458), 1281–1307. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1459>
- György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., ... Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(16), 2667–2688. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3>
- Hanisch, U.-K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, *10*(11), 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>
- Haraszi, R. A., Didiot, M.-C., Sapp, E., Leszyk, J., Shaffer, S. A., Rockwell, H. E., ... Khvorova, A. (2016). High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *Journal of Extracellular Vesicles*, *5*(1), 32570. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.32570>

- He, J., Xu, Y., Koya, D., & Kanasaki, K. (2013). Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clinical and Experimental Nephrology*, 17(4), 488–497. <https://doi.org/10.1007/s10157-013-0781-0>
- He, Y., Zhang, H., Yung, A., Villeda, S. A., Jaeger, P. A., Olayiwola, O., ... Wyss-Coray, T. (2014). ALK5-dependent TGF- β signaling is a major determinant of late-stage adult neurogenesis. *Nature Neuroscience*, 17(7), 943–952. <https://doi.org/10.1038/nn.3732>
- Herz, J., Filiano, A. J., Smith, A., Yogev, N., & Kipnis, J. (2017). Myeloid Cells in the Central Nervous System. *Immunity*, 46(6), 943–956. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2017.06.007>
- Hildebrandt, J.-P., & Lemke, S. (2011). Small bite, large impact—saliva and salivary molecules in the medicinal leech, *Hirudo medicinalis*. *Naturwissenschaften*, 98(12), 995–1008. <https://doi.org/10.1007/s00114-011-0859-z>
- Hoeffel, G., Chen, J., Lavin, Y., Low, D., Almeida, F. F., See, P., ... Ginhoux, F. (2015). C-Myb⁺ Erythro-Myeloid Progenitor-Derived Fetal Monocytes Give Rise to Adult Tissue-Resident Macrophages. *Immunity*, 42(4), 665–678. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.03.011>
- Holme, P. A., Brosstad, F., & Solum, N. O. (1993). The difference between platelet and plasma FXIII used to study the mechanism of platelet microvesicle formation. *Thrombosis and Haemostasis*, 70(4), 681–686.
- Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., ... Stevens, B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, 352(6286), 712–716. <https://doi.org/10.1126/science.aad8373>
- Hsu, C.-C., Baker, M. W., Gaasterland, T., Meehan, M. J., Macagno, E. R., & Dorrestein, P. C. (2017). Top-Down Atmospheric Ionization Mass Spectrometry Microscopy Combined With Proteogenomics. *Analytical Chemistry*, 89(16), 8251–8258. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01096>
- Huminięcki, L., Goldovsky, L., Freilich, S., Moustakas, A., Ouzounis, C., & Heldin, C.-H. (2009). Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evolutionary Biology*, 9, 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-28>
- Hyytiäinen, M., Penttinen, C., & Keski-Oja, J. (2004). Latent TGF- β Binding Proteins: Extracellular Matrix Association and Roles in TGF- β Activation. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 41(3), 233–264. <https://doi.org/10.1080/10408360490460933>
- Ineichen, B. V., Kapitzka, S., Bleul, C., Good, N., Plattner, P. S., Seyedsadr, M. S., ... Schwab, M. E. (2017). Nogo-A antibodies enhance axonal repair and remyelination in neuro-inflammatory and demyelinating pathology. *Acta*

Neuropathologica, 134(3), 423–440. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1745-3>

- Inman, G. J., Nicolás, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., ... Hill, C. S. (2002). SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Molecular Pharmacology*, 62(1), 65–74.
- Ishibashi, T., Dakin, K. A., Stevens, B., Lee, P. R., Kozlov, S. V., Stewart, C. L., & Fields, R. D. (2006). Astrocytes Promote Myelination in Response to Electrical Impulses. *Neuron*, 49(6), 823–832. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.006>
- Ishihara, A., Saito, H., & Abe, K. (1994). Transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 promote neurite sprouting and elongation of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Research*, 639(1), 21–25.
- Jan, A. T., Malik, M. A., Rahman, S., Yeo, H. R., Lee, E. J., Abdullah, T. S., & Choi, I. (2017). Perspective Insights of Exosomes in Neurodegenerative Diseases: A Critical Appraisal. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 317. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00317>
- Jansen, J. K., & Nicholls, J. G. (1972). Regeneration and changes in synaptic connections between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(3), 636–639. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4501577>
- Joshi, P., Turola, E., Ruiz, A., Bergami, A., Libera, D. D., Benussi, L., ... Verderio, C. (2014). Microglia convert aggregated amyloid- β into neurotoxic forms through the shedding of microvesicles. *Cell Death & Differentiation*, 21(4), 582–593. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.180>
- Keah, H. H., & Hearn, M. T. W. (2005). A molecular recognition paradigm: promiscuity associated with the ligand-receptor interactions of the activin members of the TGF- β superfamily. *Journal of Molecular Recognition*, 18(5), 385–403. <https://doi.org/10.1002/jmr.715>
- Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., & Richardson, W. D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience*, 9(2), 173–179. <https://doi.org/10.1038/nn1620>
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Khalil, A. M., Dotimas, H., Kahn, J., Lamerdin, J. E., Hayes, D. B., Gupta, P., & Franti, M. (2016). Differential Binding Activity of TGF- Family Proteins to Select TGF- Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 358(3), 423–430. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.232322>

- Khan, M. Z., Brandimarti, R., Shimizu, S., Nicolai, J., Crowe, E., & Meucci, O. (2008). The chemokine CXCL12 promotes survival of postmitotic neurons by regulating Rb protein. *Cell Death & Differentiation*, *15*(10), 1663–1672. <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.95>
- Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E. G., ... Prinz, M. (2013). Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nature Neuroscience*, *16*(3), 273–280. <https://doi.org/10.1038/nn.3318>
- Kim, J., Wu, H.-H., Lander, A. D., Lyons, K. M., Matzuk, M. M., & Calof, A. L. (2005). GDF11 Controls the Timing of Progenitor Cell Competence in Developing Retina. *Science*, *308*(5730), 1927–1930. <https://doi.org/10.1126/science.1110175>
- Kim, S. H., Bianco, N. R., Shufesky, W. J., Morelli, A. E., & Robbins, P. D. (2007). MHC class II+ exosomes in plasma suppress inflammation in an antigen-specific and Fas ligand/Fas-dependent manner. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *179*(4), 2235–2241. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17675484>
- Köhidaï, L. (1995). Method for determination of chemoattraction in *Tetrahymena pyriformis*. *Current Microbiology*, *30*(4), 251–253. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765899>
- Krämer-Albers, E.-M., & Hill, A. F. (2016). Extracellular vesicles: interneural shuttles of complex messages. *Current Opinion in Neurobiology*, *39*, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2016.04.016>
- Kreimer, S., Belov, A. M., Ghiran, I., Murthy, S. K., Frank, D. A., & Ivanov, A. R. (2015). Mass-Spectrometry-Based Molecular Characterization of Extracellular Vesicles: Lipidomics and Proteomics. *Journal of Proteome Research*, *14*(6), 2367–2384. <https://doi.org/10.1021/pr501279t>
- Kuffler, S. W., & Potter, D. D. (1964). GLIA IN THE LEECH CENTRAL NERVOUS SYSTEM: PHYSIOLOGICAL PROPERTIES AND NEURON-GLIA RELATIONSHIP. *Journal of Neurophysiology*, *27*(2), 290–320. <https://doi.org/10.1152/jn.1964.27.2.290>
- Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F. J., Belly, A., Bodon, G., ... Sadoul, R. (2011). Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *46*(2), 409–418. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2010.11.004>
- Lai, C. P.-K., & Breakefield, X. O. (2012). Role of Exosomes/Microvesicles in the Nervous System and Use in Emerging Therapies. *Frontiers in Physiology*, *3*, 228. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00228>
- Lan, X., Han, X., Li, Q., Yang, Q.-W., & Wang, J. (2017). Modulators of microglial activation and polarization after intracerebral haemorrhage. *Nature Reviews. Neurology*, *13*(7), 420–433. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.69>

- Larochelle, A., Bellavance, M.-A., Michaud, J.-P., & Rivest, S. (2016). Bone marrow-derived macrophages and the CNS: An update on the use of experimental chimeric mouse models and bone marrow transplantation in neurological disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1862*(3), 310–322. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2015.09.017>
- Lavin, Y., Winter, D., Blecher-Gonen, R., David, E., Keren-Shaul, H., Merad, M., ... Amit, I. (2014). Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell*, *159*(6), 1312–1326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.018>
- Le Marrec-Croq, F., Bocquet-Garcon, A., Vizioli, J., Vancamp, C., Drago, F., Franck, J., ... Lefebvre, C. (2014). Calreticulin contributes to C1q-dependent recruitment of microglia in the leech *Hirudo medicinalis* following a CNS injury. *Medical Science Monitor*, *20*. <https://doi.org/10.12659/MSM.890091>
- Le Marrec-Croq, F., Drago, F., Vizioli, J., Sautière, P.-E., & Lefebvre, C. (2013). The leech nervous system: A valuable model to study the microglia involvement in regenerative processes. *Clinical and Developmental Immunology*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/274019>
- Lee, J., McKinney, K. Q., Pavlopoulos, A. J., Han, M. H., Kim, S.-H., Kim, H. J., & Hwang, S. (2016). Exosomal proteome analysis of cerebrospinal fluid detects biosignatures of neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *Clinica Chimica Acta*, *462*, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.09.001>
- Li, Q., & Barres, B. A. (2017). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*, *18*(4), 225–242. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Di Vizio, D., Gardiner, C., ... Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *3*, 26913.
- Louveau, A., Harris, T. H., & Kipnis, J. (2015). Revisiting the Mechanisms of CNS Immune Privilege. *Trends in Immunology*, *36*(10), 569–577. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.08.006>
- Low, D. (2018). Recent advances in the understanding of microglial development and homeostasis. *Cellular Immunology*, *330*, 68–78.

<https://doi.org/10.1016/J.CELLIMM.2018.01.004>

Lu, Q. R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C. D., & Rowitch, D. H. (2002). Common Developmental Requirement for Olig Function Indicates a Motor Neuron/Oligodendrocyte Connection. *Cell*, *109*(1), 75–86. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00678-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00678-5)

Lucas, S.-M., Rothwell, N. J., & Gibson, R. M. (2009). The role of inflammation in CNS injury and disease. *British Journal of Pharmacology*, *147*(S1), S232–S240. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706400>

Macagno, E. R., Gaasterland, T., Edsall, L., Bafna, V., Soares, M. B., Scheetz, T., ... Salzet, M. (2010). Construction of a medicinal leech transcriptome database and its application to the identification of leech homologs of neural and innate immune genes. *BMC Genomics*, *11*(1), 407. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-407>

Majoros, W. H., Pertea, M., & Salzberg, S. L. (2004). TigrScan and GlimmerHMM: two open source ab initio eukaryotic gene-finders. *Bioinformatics*, *20*(16), 2878–2879. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth315>

Makwana, M., Jones, L. L., Cuthill, D., Heuer, H., Bohatschek, M., Hristova, M., ... Raivich, G. (2007). Endogenous Transforming Growth Factor 1 Suppresses Inflammation and Promotes Survival in Adult CNS. *Journal of Neuroscience*, *27*(42), 11201–11213. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2255-07.2007>

Massagué, J. (1992). Receptors for the TGF-beta family. *Cell*, *69*(7), 1067–1070. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1319842>

Matcovitch-Natan, O., Winter, D. R., Giladi, A., Vargas Aguilar, S., Spinrad, A., Sarrazin, S., ... Amit, I. (2016). Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. *Science*, *353*(6301), aad8670–aad8670. <https://doi.org/10.1126/science.aad8670>

Mathivanan, S., & Simpson, R. J. (2009). ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *PROTEOMICS*, *9*(21), 4997–5000. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900351>

McGlade-McCulloh, E., Morrissey, A. M., Norona, F., & Muller, K. J. (1989). Individual microglia move rapidly and directly to nerve lesions in the leech central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(3), 1093–1097.

Mi, H., Huang, X., Muruganujan, A., Tang, H., Mills, C., Kang, D., & Thomas, P. D. (2017). PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Research*, *45*(D1), D183–D189. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1138>

Michael, A., Bajracharya, S., Yuen, P., Zhou, H., Star, R., Illei, G., & Alevizos, I. (2010). Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Diseases*,

16(1), 34–38. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01604.x>

- Mildner, A., Huang, H., Radke, J., Stenzel, W., & Priller, J. (2017). P2Y₁₂ receptor is expressed on human microglia under physiological conditions throughout development and is sensitive to neuroinflammatory diseases. *Glia*, *65*(2), 375–387. <https://doi.org/10.1002/glia.23097>
- Morgese, V. J., Elliott, E. J., & Muller, K. J. (1983). Microglial movement to sites of nerve lesion in the leech CNS. *Brain Research*, *272*(1), 166–170.
- Moustakas, A., & Heldin, C.-H. (2009). The regulation of TGF β signal transduction. *Development*, *136*(22), 3699–3714. <https://doi.org/10.1242/dev.030338>
- Mueller, C.-A., Schluesener, H. J., Conrad, S., Meyermann, R., & Schwab, J. M. (2003). Lesional expression of a proinflammatory and antiangiogenic cytokine EMAP II confined to endothelium and microglia/macrophages during secondary damage following experimental traumatic brain injury. *Journal of Neuroimmunology*, *135*(1–2), 1–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12576219>
- Muller, K. J., & Carbonetto, S. (1979). The morphological and physiological properties of a regenerating synapse in the C.N.S. of the leech. *The Journal of Comparative Neurology*, *185*(3), 485–516. <https://doi.org/10.1002/cne.901850305>
- Muller, K. J., & Scott, S. A. (1979). Correct axonal regeneration after target cell removal in the central nervous system of the leech. *Science (New York, N.Y.)*, *206*(4414), 87–89.
- Muller, K. J., & Scott, S. A. (1980). Removal of the synaptic target permits terminal sprouting of a mature intact axon. *Nature*, *283*(5742), 89–90.
- Murgoci, A.-N., Cizkova, D., Majerova, P., Petrovova, E., Medvecky, L., Fournier, I., & Salzet, M. (2018). Brain-Cortex Microglia-Derived Exosomes: Nanoparticles for Glioma Therapy. *ChemPhysChem*, *19*(10), 1205–1214. <https://doi.org/10.1002/cphc.201701198>
- Neher, J. J., Emmrich, J. V., Fricker, M., Mander, P. K., Thery, C., & Brown, G. C. (2013). Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(43), E4098–E4107. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308679110>
- Ngu, E. M., Sahley, C. L., & Muller, K. J. (2007). Reduced axon sprouting after treatment that diminishes microglia accumulation at lesions in the leech CNS. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.21386>
- Nicholls, J. G., & Baylor, D. A. (1968). Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. *Journal of Neurophysiology*, *31*(5), 740–756. <https://doi.org/10.1152/jn.1968.31.5.740>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting Microglial Cells Are

- Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*, 308(5726), 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.11110647>
- Osier, N., Motamedi, V., Edwards, K., Puccio, A., Diaz-Arrastia, R., Kenney, K., & Gill, J. (2018). Exosomes in Acquired Neurological Disorders: New Insights into Pathophysiology and Treatment. *Molecular Neurobiology*, 55(12), 9280–9293. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1054-4>
- Otero-Ortega, L., Laso-García, F., Gómez-de Frutos, M., Fuentes, B., Diekhorst, L., Díez-Tejedor, E., & Gutiérrez-Fernández, M. (2018). Role of Exosomes as a Treatment and Potential Biomarker for Stroke. *Translational Stroke Research*. <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0654-7>
- Paolicelli, R. C., Bergamini, G., & Rajendran, L. (2018). Cell-to-cell Communication by Extracellular Vesicles: Focus on Microglia. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.04.003>
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., ... Gross, C. T. (2011). Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science*, 333(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>
- Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., ... Gan, W.-B. (2013). Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell*, 155(7), 1596–1609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030>
- Pathan, M., Keerthikumar, S., Ang, C.-S., Gangoda, L., Quek, C. Y. J., Williamson, N. A., ... Mathivanan, S. (2015). FunRich: An open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool. *PROTEOMICS*, 15(15), 2597–2601. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400515>
- Persson, U., Izumi, H., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Grimsby, S., Engström, U., ... ten Dijke, P. (1998). The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS Letters*, 434(1–2), 83–87.
- Peterson, L. K., & Fujinami, R. S. (2007). Inflammation, demyelination, neurodegeneration and neuroprotection in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 184(1–2), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.11.015>
- Pirruccello-Straub, M., Jackson, J., Wawersik, S., Webster, M. T., Salta, L., Long, K., ... Donovan, A. (2018). Blocking extracellular activation of myostatin as a strategy for treating muscle wasting. *Scientific Reports*, 8(1), 2292. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20524-9>
- Prada, I., Gabrielli, M., Turola, E., Iorio, A., D'Arrigo, G., Parolisi, R., ... Verderio, C. (2018). Glia-to-neuron transfer of miRNAs via extracellular vesicles: a new

- mechanism underlying inflammation-induced synaptic alterations. *Acta Neuropathologica*, 135(4), 529–550. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1803-x>
- Prinz, M., Erny, D., & Hagemeyer, N. (2017). Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nature Immunology*, 18(4), 385–392. <https://doi.org/10.1038/ni.3703>
- Prinz, M., & Priller, J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 15(5), 300–312. <https://doi.org/10.1038/nrn3722>
- Prinz, M., & Priller, J. (2017). The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nature Neuroscience*, 20(2), 136–144. <https://doi.org/10.1038/nn.4475>
- Rahimian, R., Cordeau, P., & Kriz, J. (2018). Brain Response to Injuries: When Microglia Go Sexist. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2018.02.048>
- Raivich, G., Bohatschek, M., Kloss, C. U., Werner, A., Jones, L. L., & Kreutzberg, G. W. (1999). Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 30(1), 77–105. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407127>
- Rajendran, L., Bali, J., Barr, M. M., Court, F. A., Krämer-Albers, E.-M., Picou, F., ... Breakefield, X. O. (2014). Emerging roles of extracellular vesicles in the nervous system. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(46), 15482–15489. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3258-14.2014>
- Ramachandran, A., Vizán, P., Das, D., Chakravarty, P., Vogt, J., Rogers, K. W., ... Hill, C. S. (2018). TGF- β uses a novel mode of receptor activation to phosphorylate SMAD1/5 and induce epithelial-to-mesenchymal transition. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.31756>
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19(8), 987–991. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology*, 200(4), 373–383. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>
- Réaux-Le Goazigo, A., Van Steenwinckel, J., Rostène, W., & Mélik Parsadaniantz, S. (2013). Current status of chemokines in the adult CNS. *Progress in Neurobiology*, 104, 67–92. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.02.001>
- Rebbapragada, A., Benchabane, H., Wrana, J. L., Celeste, A. J., & Attisano, L. (2003). Myostatin signals through a transforming growth factor beta-like signaling pathway to block adipogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 23(20), 7230–

7242. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.20.7230-7242.2003>

- Reissmann, E., Jörnvall, H., Blokzijl, A., Andersson, O., Chang, C., Minchiotti, G., ... Brivanlou, A. H. (2001). The orphan receptor ALK7 and the Activin receptor ALK4 mediate signaling by Nodal proteins during vertebrate development. *Genes & Development*, *15*(15), 2010–2022. <https://doi.org/10.1101/gad.201801>
- Rio-Hortega, P. Del. (1920). La microglia y su transformacion en celulas en bastoncito y cuerpos granulo-adiposos. *Trab Del Lab de Invest Biol*, 18–37. Retrieved from https://scholar.google.com/scholar?cluster=9417064917367251923&hl=en&as_dt=2005&scioldt=0,5
- Rio-Hortega, P. Del. (1939). THE MICROGLIA. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)60571-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)60571-8)
- Rydén, M., Imamura, T., Jörnvall, H., Belluardo, N., Neveu, I., Trupp, M., ... Ibáñez, C. F. (1996). A novel type I receptor serine-threonine kinase predominantly expressed in the adult central nervous system. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(48), 30603–30609. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.48.30603>
- Salazar, V. S., Gamer, L. W., & Rosen, V. (2016). BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nature Reviews Endocrinology*, *12*(4), 203–221. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.12>
- Sankowski, R., Mader, S., & Valdés-Ferrer, S. I. (2015). Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *9*, 28. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00028>
- Satoh, J., Kino, Y., Asahina, N., Takitani, M., Miyoshi, J., Ishida, T., & Saito, Y. (2016). TMEM119 marks a subset of microglia in the human brain. *Neuropathology*, *36*(1), 39–49. <https://doi.org/10.1111/neup.12235>
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., ... Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, *74*(4), 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Schikorski, D., Cuvillier-Hot, V., Boidin-Wichlacz, C., Slomianny, C., Salzet, M., & Tasiemski, A. (2009). Deciphering the immune function and regulation by a TLR of the cytokine EMAPII in the lesioned central nervous system using a leech model. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *183*(11), 7119–7128. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900538>
- Schilling, T., Nitsch, R., Heinemann, U., Haas, D., & Eder, C. (2001). Astrocyte-released cytokines induce ramification and outward K⁺ channel expression in microglia via distinct signalling pathways. *The European Journal of Neuroscience*, *14*(3), 463–473.

- Shafer, O. T., Chen, A., Kumar, S. M., Muller, K. J., & Sahley, C. L. (1998). Injury-induced expression of endothelial nitric oxide synthase by glial and microglial cells in the leech central nervous system within minutes after injury. *Proceedings. Biological Sciences*, *265*(1411), 2171–2175. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0555>
- Shi, Y., & Liu, J.-P. (2011). Gdf11 Facilitates Temporal Progression of Neurogenesis in the Developing Spinal Cord. *Journal of Neuroscience*, *31*(3), 883–893. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2394-10.2011>
- Shi, Y., & Massagué, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, *113*(6), 685–700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809600>
- Sieger, D., & Peri, F. (2013). Animal models for studying microglia: The first, the popular, and the new. *Glia*, *61*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1002/glia.22385>
- Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., & Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*, 6. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00006>
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., ... Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, *7*(4), 483–495. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.014>
- Sig, A. K., Guney, M., Uskudar Guclu, A., & Ozmen, E. (2017). Medicinal leech therapy— an overall perspective. *Integrative Medicine Research*, *6*(4), 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.imr.2017.08.001>
- Silvin, A., & Ginhoux, F. (2018). Microglia heterogeneity along a spatio-temporal axis: More questions than answers. *Glia*. <https://doi.org/10.1002/glia.23458>
- Skundric, D. S., Cruikshank, W. W., & Drulovic, J. (2015). Role of IL-16 in CD4+ T cell-mediated regulation of relapsing multiple sclerosis. *Journal of Neuroinflammation*, *12*(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0292-x>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Sousa, C., Biber, K., & Michelucci, A. (2017). Cellular and Molecular Characterization of Microglia: A Unique Immune Cell Population. *Frontiers in Immunology*, *8*, 198. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00198>
- Stephan, A. H., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annual Review of Neuroscience*, *35*, 369–389. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113810>
- Stevens, B., Allen, N. J., Vazquez, L. E., Howell, G. R., Christopherson, K. S., Nouri, N., ...

- Barres, B. A. (2007). The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, *131*(6), 1164–1178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.036>
- Stevens, B., Porta, S., Haak, L. L., Gallo, V., & Fields, R. D. (2002). Adenosine: A Neuron-Glial Transmitter Promoting Myelination in the CNS in Response to Action Potentials. *Neuron*, *36*(5), 855. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1201407/>
- Stuart, A. E. (1970). Physiological and morphological properties of motoneurons in the central nervous system of the leech. *The Journal of Physiology*, *209*(3), 627–646. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5499800>
- Sun, T., Pringle, N. P., Hardy, A. P., Richardson, W. D., & Smith, H. K. (1998). Pax6 Influences the Time and Site of Origin of Glial Precursors in the Ventral Neural Tube. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *12*(4–5), 228–239. <https://doi.org/10.1006/mcne.1998.0711>
- Suzuki, K., Kobayashi, T., Funatsu, O., Morita, A., & Ikekita, M. (2010). Activin A induces neuronal differentiation and survival via ALK4 in a SMAD-independent manner in a subpopulation of human neuroblastomas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *394*(3), 639–645. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.039>
- Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., ... von Mering, C. (2015). STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, *43*(Database issue), D447–52. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>
- Tahtouh, M., Croq, F., Vizioli, J., Sautiere, P.-E., Van Camp, C., Salzet, M., ... Lefebvre, C. (2009). Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord. *Molecular Immunology*, *46*(4). <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.07.026>
- Tahtouh, M., Garçon-Bocquet, A., Croq, F., Vizioli, J., Sautière, P.-E., Van Camp, C., ... Lefebvre, C. (2012). Interaction of HmC1q with leech microglial cells: Involvement of C1qBP-related molecule in the induction of cell chemotaxis. *Journal of Neuroinflammation*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-37>
- Tandon, A., Tovey, J. C. K., Sharma, A., Gupta, R., & Mohan, R. R. (2010). Role of transforming growth factor Beta in corneal function, biology and pathology. *Current Molecular Medicine*, *10*(6), 565–578. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20642439>
- Tasiemski, A., & Salzet, M. (2017). Neuro-immune lessons from an annelid: The medicinal leech. *Developmental & Comparative Immunology*, *66*, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.06.026>
- Tay, T. L., Mai, D., Dautzenberg, J., Fernández-Klett, F., Lin, G., Sagar, ... Prinz, M. (2017). A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nature Neuroscience*, *20*(6), 793–803.

<https://doi.org/10.1038/nn.4547>

- Taylor, A. R., Robinson, M. B., Gifondorwa, D. J., Tytell, M., & Milligan, C. E. (2007). Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes: Role of signaling kinases. *Developmental Neurobiology*, *67*(13), 1815–1829. <https://doi.org/10.1002/dneu.20559>
- Tesseur, I., Nguyen, A., Chang, B., Li, L., Woodling, N. S., Wyss-Coray, T., & Luo, J. (2017). Deficiency in Neuronal TGF- β Signaling Leads to Nigrostriatal Degeneration and Activation of TGF- β Signaling Protects against MPTP Neurotoxicity in Mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *37*(17), 4584–4592. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2952-16.2017>
- Tesseur, I., & Wyss-Coray, T. (2006). A role for TGF-beta signaling in neurodegeneration: evidence from genetically engineered models. *Current Alzheimer Research*, *3*(5), 505–513.
- Théry, C., Boussac, M., Véron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J., & Amigorena, S. (2001). Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *166*(12), 7309–7318. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11390481>
- Thion, M. S., Low, D., Silvin, A., Chen, J., Grisel, P., Schulte-Schrepping, J., ... Garel, S. (2018). Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner. *Cell*, *172*(3), 500–516.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.042>
- Todorovic, V., & Rifkin, D. B. (2012). LTBP5, more than just an escort service. *Journal of Cellular Biochemistry*, *113*(2), 410–418. <https://doi.org/10.1002/jcb.23385>
- Tomoda, T., Shirasawa, T., Yahagi, Y. I., Ishii, K., Takagi, H., Furiya, Y., ... Muramatsu, M. A. (1996). Transforming growth factor-beta is a survival factor for neonate cortical neurons: coincident expression of type I receptors in developing cerebral cortices. *Developmental Biology*, *179*(1), 79–90. <https://doi.org/10.1006/dbio.1996.0242>
- Trajkovic, V., Vuckovic, O., Stosic-Grujicic, S., Miljkovic, D., Popadic, D., Markovic, M., ... Mostarica Stojkovic, M. (2004). Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. *Glia*, *47*(2), 168–179. <https://doi.org/10.1002/glia.20046>
- Tremblay, M.-È., Lecours, C., Samson, L., Sánchez-Zafra, V., & Sierra, A. (2015). From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Frontiers in Neuroanatomy*, *9*, 45. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00045>
- Tremblay, M.-È., Lowery, R. L., & Majewska, A. K. (2010). Microglial Interactions with Synapses Are Modulated by Visual Experience. *PLoS Biology*, *8*(11), e1000527. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000527>

- Tsuchida, K., Nakatani, M., Yamakawa, N., Hashimoto, O., Hasegawa, Y., & Sugino, H. (2004). Activin isoforms signal through type I receptor serine/threonine kinase ALK7. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 220(1–2), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.03.009>
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., ... Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, 13(9), 731–740. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3901>
- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- van Niel, G., D’Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
- von Bernhardi, R., & Muller, K. J. (1995). TRANSFORMATION OF LEECH MICROGLIAL CELL MORPHOLOGY AND PROPERTIES FOLLOWING CO-CULTURE WITH INJURED CENTRAL NERVOUS SYSTEM TISSUE. *Journal of Neurobiology*, 27(3), 353–366. <https://doi.org/10.1002/neu.480270308>
- Wachs, F.-P., Winner, B., Couillard-Despres, S., Schiller, T., Aigner, R., Winkler, J., ... Aigner, L. (2006). Transforming Growth Factor- β 1 Is a Negative Modulator of Adult Neurogenesis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(4), 358–370. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000218444.53405.f0>
- Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S., & Nabekura, J. (2009). Resting Microglia Directly Monitor the Functional State of Synapses In Vivo and Determine the Fate of Ischemic Terminals. *Journal of Neuroscience*, 29(13), 3974–3980. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4363-08.2009>
- Walker, R. G., Poggioli, T., Katsimpardi, L., Buchanan, S. M., Oh, J., Wattrus, S., ... Lee, R. T. (2016). Biochemistry and Biology of GDF11 and Myostatin Response to Walker et al. *Circulation Research*, 118(7), 1125–1142. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308391>
- Wang, W.-Z., Emes, R. D., Christoffers, K., Verrall, J., & Blackshaw, S. E. (2005). Hirudo medicinalis: A Platform for Investigating Genes in Neural Repair. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(2), 427–440. <https://doi.org/10.1007/s10571-005-3151-y>
- Wang, Z., Hill, S., Luther, J. M., Hachey, D. L., & Schey, K. L. (2012). Proteomic analysis of urine exosomes by multidimensional protein identification technology (MudPIT). *PROTEOMICS*, 12(2), 329–338. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100477>
- Whitaker, I. S., Izadi, D., & Allen, F. (2007). A novel technique to aid vein graft

- preparation in the microsurgery laboratory. *Annals of Plastic Surgery*, 58(2), 232–233. <https://doi.org/10.1097/01.sap.0000252498.14431.47>
- Whitaker, I. S., Izadi, D., Oliver, D. W., Monteath, G., & Butler, P. E. (n.d.). *Hirudo Medicinalis* and the plastic surgeon. <https://doi.org/10.1016/j.bjps.2003.12.016>
- Wieser, R., Wrana, J. L., & Massagué, J. (1995). GS domain mutations that constitutively activate T beta R-I, the downstream signaling component in the TGF-beta receptor complex. *The EMBO Journal*, 14(10), 2199–2208.
- Wisztorski, M., Fatou, B., Franck, J., Desmons, A., Far E, I., Leblanc, E., ... Salzet, M. (2013). Microproteomics by liquid extraction surface analysis: Application to FFPE tissue to study the fimbria region of tubo-ovarian cancer. *Proteomics Clin. Appl*, 7, 1–7. <https://doi.org/10.1002/prca.201200070>
- Wong, K., Noubade, R., Manzanillo, P., Ota, N., Foreman, O., Hackney, J. A., ... Ouyang, W. (2017). Mice deficient in NRROS show abnormal microglial development and neurological disorders. *Nature Immunology*, 18(6), 633–641. <https://doi.org/10.1038/ni.3743>
- Wrana, J. L. (2013). Signaling by the TGFβ superfamily. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(10), a011197. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011197>
- Wu, H.-H., Ivkovic, S., Murray, R. C., Jaramillo, S., Lyons, K. M., Johnson, J. E., & Calof, A. L. (2003). Autoregulation of neurogenesis by GDF11. *Neuron*, 37(2), 197–207.
- Xu, J., Wang, T., Wu, Y., Jin, W., & Wen, Z. (2016). Microglia Colonization of Developing Zebrafish Midbrain Is Promoted by Apoptotic Neuron and Lysophosphatidylcholine. *Developmental Cell*, 38(2), 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.06.018>
- Xu, Y. X., Bolton, B., Zipser, B., Jellies, J. A., Johansen, K. M., & Johansen, J. E. (1999). Gliarin and macrolin, two novel intermediate filament proteins specifically expressed in sets and subsets of glial cells in leech central nervous system. *Undefined*. Retrieved from <https://www.semanticscholar.org/paper/Gliarin-and-macrolin%2C-two-novel-intermediate-in-and-Xu-Bolton/a10329d4fbb0d983435ed7b56aa6b4543d44b2ac>
- Yi, J. J., Barnes, A. P., Hand, R., Polleux, F., & Ehlers, M. D. (2010). TGF-beta signaling specifies axons during brain development. *Cell*, 142(1), 144–157. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.010>
- Zappulli, V., Friis, K. P., Fitzpatrick, Z., Maguire, C. A., & Breakefield, X. O. (2016). Extracellular vesicles and intercellular communication within the nervous system. *Journal of Clinical Investigation*, 126(4), 1198–1207. <https://doi.org/10.1172/JCI81134>
- Zeng, H., & Sanes, J. R. (2017). Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(9), 530–

546. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.85>

Zerbino, D. R. (2010). Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. *Current Protocols in Bioinformatics, Chapter 11*, Unit 11.5. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1105s31>

Zhan, Y., Paolicelli, R. C., Sforzini, F., Weinhard, L., Bolasco, G., Pagani, F., ... Gross, C. T. (2014). Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. <https://doi.org/10.1038/nn.3641>

Zhang, F., Zhong, R., Li, S., Fu, Z., Cheng, C., Cai, H., & Le, W. (2017). Acute Hypoxia Induced an Imbalanced M1/M2 Activation of Microglia through NF- κ B Signaling in Alzheimer's Disease Mice and Wild-Type Littermates. *Frontiers in Aging Neuroscience, 9*, 282. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00282>

Zöllner, T., Schneider, A., Kleimeyer, C., Masuda, T., Potru, P. S., Pfeifer, D., ... Spittau, B. (2018). Silencing of TGF β signalling in microglia results in impaired homeostasis. *Nature Communications, 9*(1), 4011. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06224-y>

ANNEXES

Annexe 1 : Alignement de séquences des membres de la famille TGF-β avec le ligand nGDF.

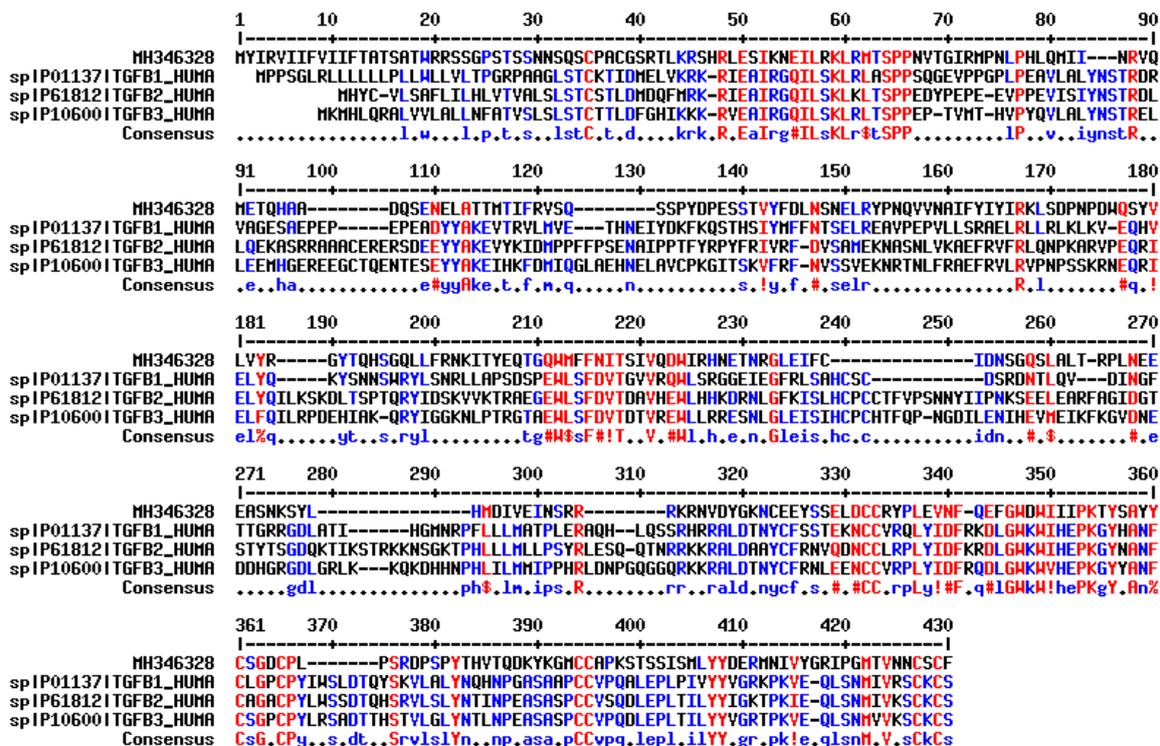


Figure 56: Alignement multiple avec TGF- β 1/2/3. La comparaison de séquence en BlastP montre que notre ligands nGDF a une identité de 23% et une homologie de séquence de 41% avec TGF-β1, une identité de 23% et une homologie de séquence de 40% avec TGF-β2, et une identité de 25% et une homologie de séquence de 41% avec TGF-β3.

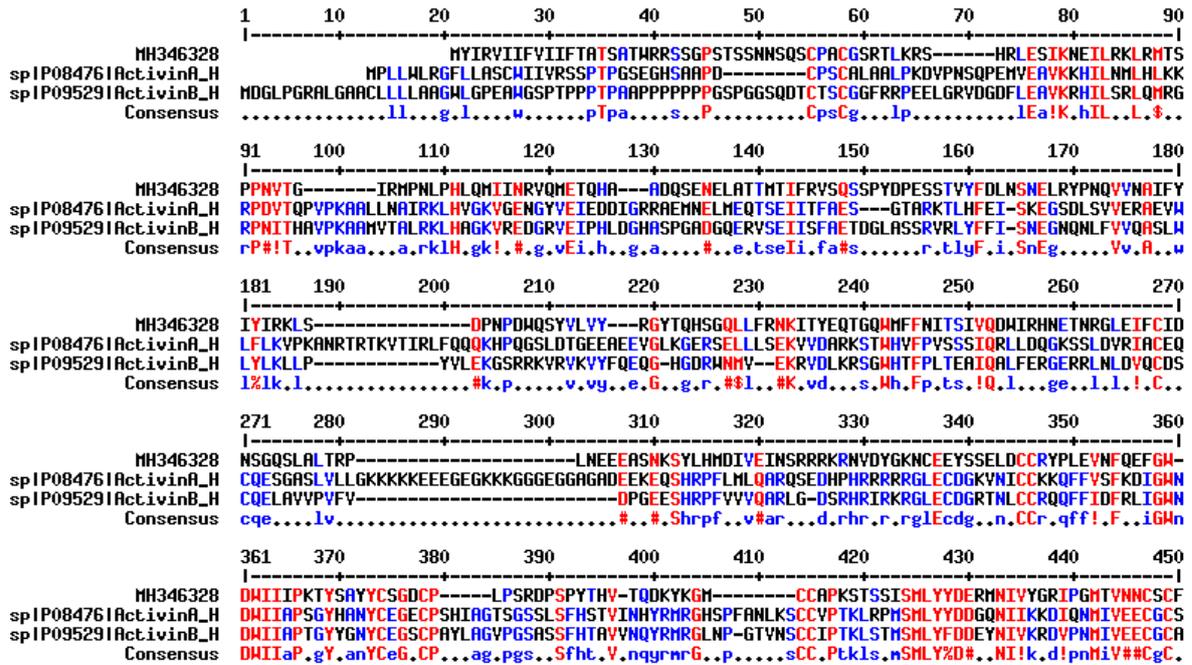


Figure 57: Alignement multiple du ligand nGDF chez la sangsue avec Activine A et B. La comparaison de séquence en BlastP montre que notre ligand nGDF a une identité de 26% et une homologie de séquence de 38% avec Activine A, et une identité de 26% et une homologie de séquence de 43% avec Activine B.

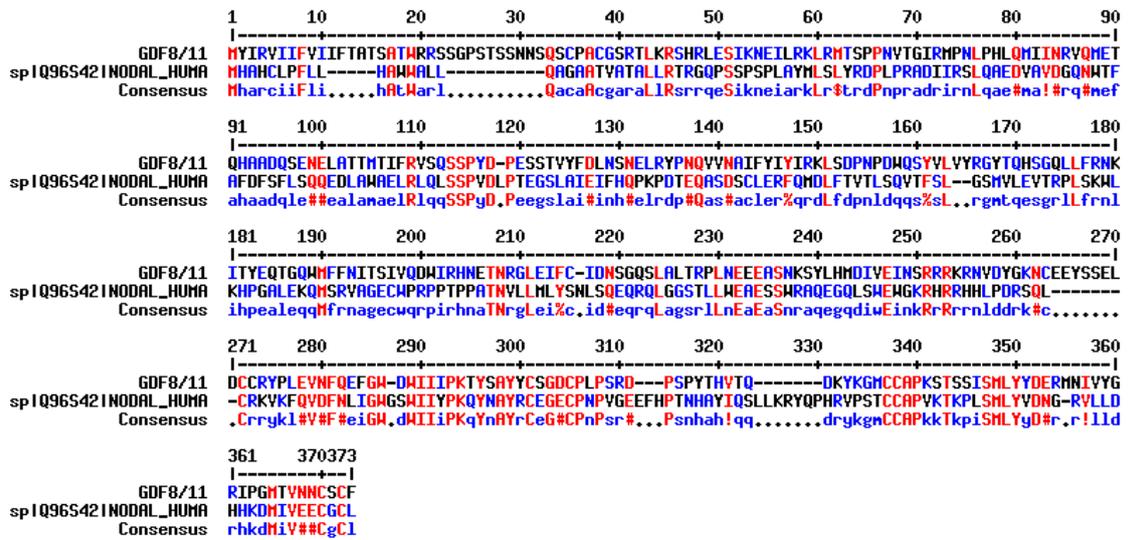


Figure 58: Alignement multiple du ligand nGDF chez la sangsue avec Nodal. La comparaison de séquence en BlastP montre que notre ligands nGDF a une identité de 32% et une homologie de séquence de 46% avec nodal.

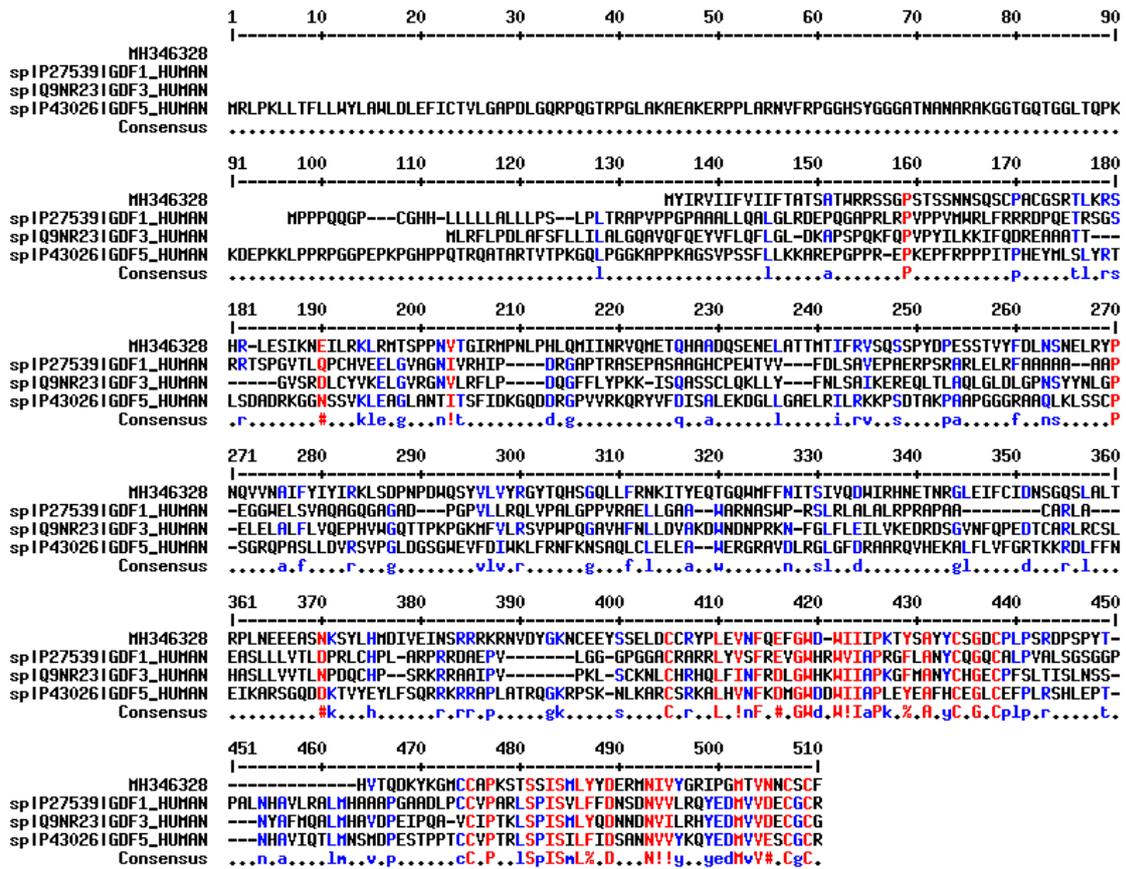


Figure 59: Alignement multiple avec GDF 1/3/5. La comparaison de séquence en BlastP montre que notre ligands nGDF a une identité de 34% et homologie de séquence de 45% avec GDF1, une identité de 29% et homologie de séquence de 43% avec GDF3, et une identité de 37% et homologie de séquence de 46% avec GDF5.

Annexe 2 : Liste des protéines exclusives représentées dans les diagrammes de Venn

Tableau 2: Liste des protéines exclusives représentées dans les diagrammes de Venn. Protéines exclusives représentées dans les diagrammes de Venn (représentés sur la Figure 40) correspondant à l'analyse par le logiciel Perseus des échantillons selon les différents temps post-lésion avec SB431542 ou avec le véhicule séparément. En gras les protéines exclusives.

| Véhicule Exclusives | | | Inhibiteur Exclusives | | |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| T0 | T6h | T24h | T0 | T6h | T24h |
| HGS (O14964) | COL6A3 (P12111) | ACLY (P53396) | CRYZ (Q08257) | LGR5 (O75473) | ANK3 (Q12955) |
| GMPPB (Q9Y5P6) | ANXA7 (P20073) | CRYZ (Q08257) | ATP1B1 (P05026) | PSMB8 (P28062) | HRSP12 (P52758) |
| ATIC (P31939) | ANPEP (P15144) | ISOC2 (Q96AB3) | CST4 (P01036) | AHNAK (Q09666) | LAMA2 (P24043) |
| BLOC156 (Q39UL45) | MAP1S (Q66K74) | CTSL (P07711) | GMPPB (Q9Y5P6) | UGP2 (Q16851) | PMPCB (O75439) |
| HMOX2 (P30519) | NDUFV2 (P19404) | LAMA2 (P24043) | UGP2 (Q16851) | KLHDC8A (Q8IYD2) | DYNC1H1 (Q14204) |
| LCT (P09848) | DLAT (P10515) | LGR5 (O75473) | SAR1B (Q9Y6B6) | GNAQ (P50148) | CPNE2 (Q96FN4) |
| SLC44A4 (Q53GD3) | PNP (P00491) | PSMA8 (Q8TAA3) | SBF2 (Q86WG5) | DLAT (P10515) | EHD3 (Q9NZN3) |
| SBSPON (Q8IVN8) | PHYH (O14832) | ALDH4A1 (P30038) | ATIC (P31939) | MYH3 (P11055) | ALDH18A1 (P54886) |
| MDH2 (P40926) | GNB2L1 (P63244) | DYNC1H1 (Q14204) | PSMA8 (Q8TAA3) | AARS (P49588) | PRMT1 (Q99873) |
| ANK2 (Q01484) | PCYT2 (Q99447) | ANK3 (Q12955) | SYAP1 (Q96A49) | YKT6 (O15498) | ACO2 (Q99798) |
| GMPPB (Q9P2T1) | LMNA (P02545) | ASAH1 (Q13510) | BLOC156 (Q9UL45) | PTGES3 (Q15185) | HIST4H4 (P62805) |
| NAMPT (P43490) | RAP2C (Q9Y3L5) | PLEC (Q15149) | GLA (P06280) | SEPHS1 (P49903) | NT5C2 (P49902) |
| MGAT5B (Q3V5L5) | MAP3K20 (Q9NYL2) | OAT (P04181) | PTS (Q03393) | PDXK (O00764) | ADPRH (P54922) |
| RAB18 (Q9NP72) | AQP4 (P55087) | GNAQ (P50148) | PSMA6 (P60900) | AIMP1 (Q12904) | CALR (P27797) |
| CNN1 (P51911) | PYCR1 (P32322) | DPYSL4 (O14531) | LCT (P09848) | RPS14 (P62263) | |
| NID1 (P14543) | SELENBP1 (Q13228) | TOM1L2 (Q6ZVM7) | ASAH1 (Q13510) | PSMB5 (P28074) | |
| PFKL (P17858) | COL6A5 (A8TX70) | ACAT2 (Q9BWD1) | GRK1 (Q15835) | FAH (P16930) | |
| GLUL (P15104) | RAP1B (P61224) | FKBP1A (P62942) | HARS (P12081) | PSMD7 (P51665) | |
| PSMA4 (P25789) | DPYS (Q14117) | ACO2 (Q99798) | MDH2 (P40926) | CLIC4 (Q9Y696) | |
| ANK3 (Q12955) | HIRA (P54198) | MINPP1 (Q9UNW1) | RAB1A (P62820) | P4HB (P07237) | |
| PRKCSH (P14314) | PAICS (P22234) | NT5C2 (P49902) | ANK2 (Q01484) | ACTN1 (P12814) | |
| TCEB1 (Q15369) | ATP2B2 (Q01814) | DHX9 (Q08211) | PLEC (Q15149) | | |
| GOT1 (P17174) | GRIA1 (P42261) | CDON (Q4KMG0) | GCAT (O75600) | | |
| ARPC5L (Q9BPX5) | GCLC (P48506) | PMPCB (O75439) | HSPA8 (P11142) | | |
| PIP (P12273) | BPNT1 (O95861) | NDUF57 (O75251) | GMPPB (Q9P2T1) | | |
| PSMD13 (Q9UNM6) | UBA52 (P62987) | PSMD2 (Q13200) | NAMPT (P43490) | | |
| RAB35 (Q15286) | ATP1A1 (P05023) | CCT3 (P49368) | MGAT5B (Q3V5L5) | | |
| ATG3 (Q9NT62) | ATP1A3 (P13637) | | ACHE (P22303) | | |
| DNAJB1 (P25685) | GCH1 (P30793) | | MVP (Q14764) | | |
| NCS1 (P62166) | ACTN3 (Q08043) | | 37500 (Q15019) | | |
| GLUD2 (P49448) | ACTC1 (P68032) | | RAB18 (Q9NP72) | | |
| CAT (P04040) | CPNE6 (O95741) | | CNPY4 (Q8N129) | | |
| CHL1 (O00533) | ATP1B1 (P05026) | | CNN1 (P51911) | | |
| SLC9A3R2 (Q15599) | AKR1A1 (P14550) | | PFKL (P17858) | | |
| RRAS2 (P62070) | TPRG1L (Q5TOD9) | | ATP5J2 (P56134) | | |
| LHPP (Q9H008) | IMPA1 (P29218) | | PSMA4 (P25789) | | |
| ADCY9 (O60503) | ANXA5 (P08758) | | KIAA1161 (Q6NSJ0) | | |
| ADPRH (P54922) | CNTN1 (Q12860) | | DCTN1 (Q14203) | | |
| PAK3 (O75914) | QARS (P47897) | | DPYSL4 (O14531) | | |
| | FLNB (O75369) | | TCEB1 (Q15369) | | |
| | APRT (P07741) | | GOT1 (P17174) | | |
| | RAB8A (P61006) | | HYOU1 (Q9Y4L1) | | |
| | UBE2L3 (P68036) | | ARRB1 (P49407) | | |
| | ATP5H (O75947) | | ATP1A3 (P13637) | | |
| | CHP1 (Q99653) | | GMDS (O60547) | | |
| | GBE1 (Q04446) | | RBKS (Q9H477) | | |
| | ATP6V1A (P38606) | | PIP (P12273) | | |
| | COX4I1 (P13073) | | PSMD13 (Q9UNM6) | | |
| | FLOT1 (O75955) | | TPD52 (P55327) | | |
| | ACAT1 (P24752) | | PMM2 (O15305) | | |
| | GDI1 (P31150) | | ATP6V1G1 (O75348) | | |
| | QSOX1 (O00391) | | ATP2B1 (P20020) | | |
| | TUBA1A (Q71U36) | | DNAJB1 (P25685) | | |
| | NPEPPS (P55786) | | CAPZA1 (P52907) | | |
| | GNGT1 (P63211) | | PTPRN (Q16849) | | |
| | DCTN3 (O75935) | | NCS1 (P62166) | | |
| | PSMA2 (P25787) | | SKI (P12755) | | |
| | TNIP2 (Q8NFZ5) | | TBCA (O75347) | | |
| | ANK2 (Q01484) | | ECE1 (P42892) | | |
| | ACO1 (P21399) | | LHPP (Q9H008) | | |
| | ALDH18A1 (P54886) | | ADCY9 (O60503) | | |

| | | | | | |
|--|------------------------|--|-------------------------|--|--|
| | ADRBK1 (P25098) | | LMNA (P02545) | | |
| | DYNC1H1 (Q14204) | | DHX9 (Q08211) | | |
| | SRI (P30626) | | NAP1L4 (Q99733) | | |
| | CAPN3 (P20807) | | PSMF1 (Q92530) | | |
| | | | CCT8 (P50990) | | |
| | | | GLUL (P15104) | | |
| | | | PAK3 (O75914) | | |
| | | | NDUFA10 (O95299) | | |

Annexe 3 : Liste des protéines surexprimées identifiées dans des clusters spécifiques

Tableau 3 : Liste des protéines surexprimées identifiées dans des clusters spécifiques. Protéines surexprimées identifiées dans des clusters spécifiques (extraites des deux Heatmaps illustrées à la Figure 41) après l'analyse par le logiciel Perseus des échantillons de différents temps post-lésion avec SB431542 ou avec le véhicule séparément. En gras les protéines exclusives.

| Véhicule Heatmap | | | Inhibiteur Heatmap | | |
|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 | Cluster 1 | Cluster 2 | Cluster 3 |
| TPM2 (P07951) | HSPA5 (P11021) | NCAM2 (O15394) | TPM2 (P07951) | PEF1 (Q9UBV8) | LETM1 (O95202) |
| HSP90AB1 (P08238) | EHD1 (Q9H4M9) | TSPAN1 (O60635) | PRKAR2A (P13861) | CLYBL (Q8N0X4) | FLOT2 (Q14254) |
| YWHAB (P31946) | HSPD1 (P10809) | EML1 (O00423) | TSPAN7 (P41732) | SLC13A5 (Q86YT5) | PAPSS1 (O43252) |
| PABPC1 (P11940) | GSN (P06396) | HAGH (Q16775) | NSF (P46459) | RAB39A (Q14964) | EML1 (O00423) |
| WDR1 (O75083) | TPT1 (P13693) | PPP2CA (P67775) | PYGB (P11216) | HSPE1 (P16104) | NEFL (P07196) |
| FABP5 (Q01469) | LAP3 (P28838) | GNAO1 (P09471) | EHD1 (Q9H4M9) | CDC42 (P60953) | ACTA2 (P62736) |
| RDX (P35241) | DPYSL2 (Q16555) | PGK2 (P07205) | ATP5A1 (P25705) | ALDH18A1 (P54886) | ATP5B (P06576) |
| VWASA (O00534) | ANK3 (Q12955) | RPS23 (P62266) | NEFL (P07196) | CMPK1 (P30085) | TNS1 (Q9HBL0) |
| PYGM (P11217) | CAP1 (Q01518) | CDC42 (P60953) | HSP90AB1 (P08238) | ACHE (P22303) | ACSS2 (Q9NR19) |
| CSTB (P04080) | GARS (P41250) | CRYZ (Q08257) | ANXA7 (P20073) | GSTA1 (P08263) | SLC25A31 (Q9H0C2) |
| TST (Q16762) | TPM1 (P09493) | NDUF53 (O75489) | YWHAB (P31946) | | SSUH2 (Q9Y2M2) |
| HSPA8 (P11142) | GSTA4 (O15217) | NSF (P46459) | HSPD1 (P10809) | | |
| TTC38 (Q5R3I4) | | | MDH2 (P40926) | | |
| HSPA4L (O95757) | | | AHCY (P23526) | | |
| MAP1S (Q66K74) | | | CAPN2 (P17655) | | |
| GSN (P06396) | | | RAB3A (P20336) | | |
| ST13 (P50502) | | | PDHB (P11177) | | |
| GPI (P06744) | | | OGDH (Q02218) | | |
| GNB4 (Q9HAV0) | | | EML2 (O95834) | | |
| AHSA1 (O95433) | | | CBR1 (P16152) | | |
| PFN1 (P07737) | | | PPP3CB (P16298) | | |
| NCS1 (P62166) | | | BFSP2 (Q13515) | | |
| DBNL (Q9UJU6) | | | MSN (P26038) | | |
| SARS (P49591) | | | RDX (P35241) | | |
| SUCLA2 (Q9P2R7) | | | DLD (P09622) | | |
| REEP5 (Q00765) | | | VWASA (O00534) | | |
| CAPNS1 (P04632) | | | PYGM (P11217) | | |
| ARL8A (Q96BM9) | | | NFS1 (Q9Y697) | | |
| | | | CSTB (P04080) | | |
| | | | ATP1A3 (P13637) | | |
| | | | SUCLA2 (Q9P2R7) | | |
| | | | OGDHL (Q9ULD0) | | |
| | | | ATP6V1E1 (P36543) | | |
| | | | PDHA1 (P08559) | | |
| | | | HSPA9 (P38646) | | |
| | | | LLGL2 (Q6P1M3) | | |
| | | | SUCLG1 (P53597) | | |
| | | | SPTB (P11277) | | |
| | | | SOD1 (P00441) | | |
| | | | HSP90AA1 (P07900) | | |
| | | | AMT (P48728) | | |
| | | | GNAQ (P50148) | | |
| | | | HSPA4L (O95757) | | |
| | | | FH (P07954) | | |
| | | | NDUFV1 (P49821) | | |
| | | | VCP (P55072) | | |
| | | | SDHD (O14521) | | |
| | | | MAP1S (Q66K74) | | |
| | | | CDC37 (Q16543) | | |
| | | | BLOC1S6 (Q9UL45) | | |
| | | | COL1A2 (P08123) | | |
| | | | LASP1 (Q14847) | | |
| | | | IDH2 (P48735) | | |
| | | | PRDX2 (P32119) | | |
| | | | PARK7 (Q99497) | | |
| | | | ACAT1 (P24752) | | |
| | | | PPIA (P62937) | | |
| | | | SERPINB1 (P30740) | | |
| | | | CAPSL (Q8WWF8) | | |
| | | | UQCRCF1 (P47985) | | |
| | | | SCCPDH (Q8NBX0) | | |

| | | | | | |
|--|--|--|-------------------------|--|--|
| | | | ATP5C1 (P36542) | | |
| | | | SDHA (P31040) | | |
| | | | GPI (P06744) | | |
| | | | CCT6A (P40227) | | |
| | | | PPP2R1A (P30153) | | |
| | | | TCP1 (P17987) | | |
| | | | PFN1 (P07737) | | |
| | | | IDH3A (P50213) | | |
| | | | STXBP1 (P61764) | | |
| | | | ADD1 (P35611) | | |
| | | | NCS1 (P62166) | | |
| | | | ANXA2 (P07355) | | |
| | | | CALR (P27797) | | |
| | | | DBNL (Q9UJU6) | | |
| | | | YWHAE (P62258) | | |
| | | | EIF5A (P63241) | | |
| | | | CS (O75390) | | |
| | | | ANXA13 (P27216) | | |
| | | | ALDH2 (P05091) | | |
| | | | EEF2 (P13639) | | |
| | | | ATP1A2 (P50993) | | |
| | | | BPNT1 (O95861) | | |
| | | | MVP (Q14764) | | |
| | | | ATP1A1 (P05023) | | |
| | | | YWHAZ (P63104) | | |
| | | | VDAC2 (P45880) | | |
| | | | REEP5 (Q00765) | | |
| | | | CAPNS1 (P04632) | | |
| | | | MDH1 (P40925) | | |

Annexe 4 : Liste des protéines exclusives représentées dans les diagrammes de Venn

Tableau 4 : Liste des protéines exclusives représentées dans les diagrammes de Venn. Protéines exclusives représentées dans les diagrammes de Venn (représentés sur la Figure 42) correspondant à l'analyse par le logiciel Perseus des échantillons (temps par temps) issus de la condition d'inhibition par SB431542 vs. véhicule. Les protéines impliquées dans une voie biologique (Figure 43) ont été marquées par des chiffres différents dans le tableau (1 CXCR4-mediated signaling events, 2 Neurotrophic factor-mediated Trk receptor signaling, 3 Apoptosis, 4 Cell-Cell communication, 5 Axon guidance, 6 Innate Immune System). En gras les protéines exclusives.

| T0h | | T6h | | T24h | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| Véhicule | Inhibiteur | Véhicule | Inhibiteur | Véhicule | Inhibiteur |
| ABHD11 (Q8NFV4) | 37500 (Q15019) | 51776 (Q9NYL2) | AARS (P49588) | ANK2 (Q01484) 5 | ACHE (P22303) |
| ADAD1 (Q96M93) | ACHE (P22303) | ACAT1 (P24752) | ACTN1 (P12814) | DCTN1 (Q14203) | AHNAK (Q09666) |
| ADPRH (P54922) | AHCY (P23526) | ACO1 (P21399) | AHNAK (Q09666) | GCH1 (P30793) | FAH (P16930) |
| ARPC5L (Q9BPX5) | AHCYL1 (Q43865) | ACTC1 (P68032) | AIMP1 (Q12904) | GLA (P06280) | KIAA1161 (Q6NSJ0) |
| CAT (P04040) | AKR1A1 (P14550) | ACTN3 (Q08043) 4 | ANK3 (Q12955) | GMDS (O60547) | MGAT5B (Q3V5L5) |
| CBR1 (P16152) | ANK2 (Q01484) 5 | ADRBK1 (P25098) | ATG3 (Q9NT62) | HARS (P12081) | NPEPPS (P55786) |
| CD9 (P21926) | ANK3 (Q12955) | ALDH18A1 (P54886) | ATP1B1 (P05026) | LHPP (Q9H008) | |
| CDC42 (P60953) | ARPC3 (O15145) | ANK2 (Q01484) 5 | CAPZB (P47756) | MINPP1 (Q9UNW1) | |
| 1 2 5 | ASAHI1 (Q13510) | ANPEP (P15144) | CDON (Q4KMG0) | MVP (Q14764) | |
| CHL1 (O00533) 5 | ATP1A3 (P13637) | ANXA5 (P08758) | CLIC4 (Q9Y696) | PSMD13 (Q9UNM6) | |
| EHD3 (Q9NZN3) | ATP5J2 (P56134) | ANXA7 (P20073) | CPVL (Q9H3G5) | PTPRN (Q16849) | |
| ESYT2 (A0FGR8) | CAPZA1 (P52907) 6 | APRT (P07741) | CRYBG3 (Q68DQ2) | PYCR1 (P32322) | |
| FH (P07954) | CAPZB (P47756) | AQP4 (P55087) | CTSL (P07711) | | |
| FLNA (P21333) | CCT2 (P78371) | ARF1 (P84077) | DLAT (P10515) | | |
| 1 4 | CFL2 (Q9Y281) | ATP1A1 (P05023) | DYNLL2 (Q96FJ2) 3 | | |
| HGS (O14964) 1 | CNPY4 (Q8N129) | ATP1A3 (P13637) | ENTPD5 (O75356) | | |
| HSD17B10 (Q99714) | CPNE7 (Q9UBL6) | ATP1B1 (P05026) | FAH (P16930) | | |
| KIF5B (P33176) | CRYZ (Q08257) | ATP2B2 (Q01814) | FKBP1A (P62942) 1 | | |
| MATN1 (P21941) | CST4 (P01036) | ATP5H (O75947) | FLNC (Q14315) | | |
| MIF (P14174) | CTSL (P07711) | ATP6V1A (P38606) | GLUD2 (P49448) | | |
| NSF (P46459) | DCTN1 (Q14203) | ATP6V1G1 (O75348) | GLUL (P15104) | | |
| PCK2 (Q16822) | DHX9 (Q08211) | BPNT1 (O95861) | GNAQ (P50148) | | |
| PRKCSH (P14314) 6 | DPYS (Q14117) | CALR (P27797) | HMOX2 (P30519) | | |
| QDPR (P09417) | DPYSL4 (O14531) 5 | CAPN3 (P20807) | HSPA12B (Q96MM6) | | |
| SYNE1 (Q8NF91) | ECE1 (P42892) | CAPN5 (O15484) | KLHDC8A (Q8IYD2) | | |
| TUBA4A (P68366) | FKBP1A (P62942) 1 | CAPZA1 (P52907) 5 | LASP1 (Q14847) | | |
| | GLA (P06280) | CHP1 (Q99653) 1 | LGR5 (O75473) | | |
| | GLUL (P15104) | CNTN1 (Q12860) 5 | MAP1S (Q66K74) | | |
| | GMDS (O60547) | COL6A3 (P12111) | MINPP1 (Q9UNW1) | | |
| | GPT2 (Q8TD30) | COL6A5 (A8TX70) | MYH3 (P11055) | | |
| | HSPA12B (Q96MM6) | COX4I1 (P13073) | NDUFS7 (O75251) | | |
| | HYOU1 (Q9Y4L1) | CPNE2 (Q96FN4) | NID1 (P14543) | | |
| | KIAA1161 (Q6NSJ0) | CPNE6 (O95741) | NSF (P46459) | | |
| | KLC2 (Q9H0B6) | CPNE7 (Q9UBL6) | OTOF (Q9HC10) | | |
| | LAP3 (P28838) | DBNL (Q9UJU6) | P4HB (P07237) | | |
| | LRP2 (P98164) | DCTN3 (O75935) | PDXK (O00764) | | |
| | MINPP1 (Q9UNW1) | DLAT (P10515) | PIN4 (Q9Y237) | | |
| | MTHFD2L (Q9H903) | DYNC1H1 (Q14204) | PIP4K2A (P48426) | | |
| | MVP (Q14764) | EHD1 (Q9H4M9) | PREP (P48147) | | |
| | NDUFA10 (O95299) | EHD3 (Q9NZN3) | PRTFDC1 (Q9NRG1) | | |
| | NDUFS2 (O75306) | FLNB (O75369) | PSMB1 (P20618) 3 | | |
| | NDUFS7 (O75251) | FLOT1 (O75955) | PSMB5 (P28074) 3 | | |
| | OAT (P04181) | GBE1 (Q04446) | PSMB8 (P28062) 3 | | |
| | PAFAH1B2 (P68402) | GCAT (O75600) | PSMD7 (P51665) 3 | | |
| | PCK2 (Q16822) | GCH1 (P30793) | PTGES3 (Q15185) | | |
| | PLEC (Q15149) 3 | GCLC (P48506) | RAB35 (Q15286) | | |
| | PMPCB (O75439) | GDI1 (P31150) | RPLP0 (P05388) | | |
| | PPP2CA (P67775) | GNB2L1 (P63244) 1 | RPS14 (P62263) | | |
| | PSMA6 (P60900) 3 | GNGT1 (P63211) | RRAS2 (P62070) | | |
| | PSMA8 (Q8TAA3) 3 | GRIA1 (P42261) | SBSPON (Q8IVN8) | | |
| | PSMD2 (Q13200) 3 | HARS (P12081) | SDHD (O14521) | | |
| | PSMF1 (Q92530) 3 | HECTD3 (Q5T447) | SEPHS1 (P49903) | | |
| | PTPRN (Q16849) | HIRA (P54198) | SH3BGR (P55822) | | |
| | RPLP0 (P05388) | IMPA1 (P29218) | SLC44A1 (Q8WWI5) | | |

| | | | | |
|--|-----------------------|----------------------------|-------------------|--|
| | SAR1B (Q9Y6B6) | LRP2 (P98164) | SLC44A4 (Q53GD3) | |
| | SBF2 (Q86WG5) | MAP1S (Q66K74) | SLC9A3R2 (Q15599) | |
| | SKI (P12755) | MAPK14 (Q16539) ① ② ④ ⑤ | TMSB15A (P0CG35) | |
| | SYAP1 (Q96A49) | NAP1L4 (Q99733) | TNS1 (Q9HBL0) | |
| | TBCA (O75347) | NDUFV2 (P19404) | TPPP2 (P59282) | |
| | TFG (Q92734) | NID2 (Q14112) | UGP2 (Q16851) | |
| | TMSB15A,B (P0CG35) | NPEPPS (P55786) | YKT6 (O15498) | |
| | TPD52 (P55327) | NUDC (Q9Y266) | | |
| | VWA7 (Q9Y334) | PAICS (P22234) | | |
| | | PCK2 (Q16822) | | |
| | | PCYT2 (Q99447) | | |
| | | PDCD6IP (Q8WUM4) | | |
| | | PHYH (O14832) | | |
| | | PMM2 (O15305) | | |
| | | PNP (P00491) | | |
| | | PRKAR2A (P13861) | | |
| | | PSMA2 (P25787) ③ | | |
| | | PSMA6 (P60900) ③ | | |
| | | PTS (Q03393) | | |
| | | PYCR1 (P32322) | | |
| | | QARS (P47897) | | |
| | | QSOX1 (O00391) | | |
| | | RAB1A (P62820) | | |
| | | RAB8A (P61006) | | |
| | | RAP1B (P61224) ① ② ⑤ | | |
| | | RAP2C (Q9Y3L5) | | |
| | | SELENBP1 (Q13228) | | |
| | | SRI (P30626) | | |
| | | STXBP1 (P61764) | | |
| | | TBCB (Q99426) | | |
| | | TCP1 (P17987) | | |
| | | THOP1 (P52888) | | |
| | | TNIP2 (Q8NFZ5) | | |
| | | TOM1 (O60784) | | |
| | | TPRG1L (Q5T0D9) | | |
| | | TUBA1A (Q71U36) | | |
| | | UBA52 (P62987) ③ ⑥ | | |
| | | UBE2L3 (P68036) | | |
| | | UGP2 (Q16851) | | |
| | | YES1 (P07947) ① | | |

Annexe 5 : Liste des protéines surreprésentées de Heatmaps

Tableau 5 : Liste des protéines surreprésentées de Heatmaps. Protéines identifiées dans des clusters spécifiques (extraites des trois Heatmaps illustrées à la Figure 42) après l'analyse par le logiciel Perseus des échantillons (temps par temps) issus de l'inhibition par SB431542 vs. véhicule. Les protéines impliquées dans une voie biologique (Figure 43) ont été marquées par des chiffres différents dans le tableau (1 CXCR4-mediated signaling events, 2 Neurotrophic factor-mediated Trk receptor signaling, 3 Apoptosis, 4 Cell-Cell communication, 5 Axon guidance, 6 Innate Immune System). En gras les protéines exclusives.

| T0h | | T6h | | T24h | |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Véhicule | Inhibiteur | Véhicule | Inhibiteur | Véhicule | Inhibiteur |
| AMPD3 (Q01432) | ADD1 (P35611) ③ | ACSS2 (Q9NR19) | BPNT1 (O95861) | ACADL (P28330) | PPP3CB (P16298) |
| CRYBG3 (Q68DQ2) | ATP5A1 (P25705) | ANK3 (Q12955) | C21ORF33 (P30042) | CMPK1 (P30085) | SSUH2 (Q9Y2M2) |
| ENOPH1 (Q9UHY7) | BPNT1 (O95861) | ANXA13 (P27216) | CYCS (P99999) ⑤ | FLNC (Q14315) ④ | TPM2 (P07951) |
| FLNC (Q14315) ④ | C21ORF33 (P30042) | BFSP2 (Q13515) | GSTA1 (P08263) | GYG1 (P46976) | |
| NARS (O43776) | CRYBG3 (Q68DQ2) | CALCOCO2 (Q13137) | MAP1S (Q66K74) | HSPA5 (P11021) | |
| RAB11A (P62491) | EML2 (O95834) | CALR (P27797) | MYH4 (Q9Y623) | HSPA8 (P11142) | |
| TUBA4A (P68366) | FLII (Q13045) | CAP1 (Q01518) ⑤ | PEF1 (Q9UBV8) | NTRK2 (Q16620) ② | |
| VAT1L (Q9HCJ6) | GNAQ (P50148) | CS (O75390) | SCCPDH (Q8NBX0) | PCYT2 (Q99447) | |
| XPNPEP1 (Q9NQW7) | HSPD1 (P10809) | EHD1 (Q9H4M9) | SDHD (O14521) | PDHA1 (P08559) | |
| LCP1 (P13796) | MVP (Q14764) | ENTPD1 (P49961) | WDR1 (O75083) | YWHAZ (P63104) ② | |
| CLYBL (Q8NOX4) | NDUFS1 (P28331) | FH (P07954) | YWHAZ (P63104) ② | | |
| | NEFL (P07196) | FLII (Q13045) | | | |
| | OGDHL (Q9ULD0) | FSCN1 (Q16658) | | | |
| | PGK2 (P07205) | GNAO1 (P09471) ① | | | |
| | PIP4K2A (P48426) | GPI (P06744) | | | |
| | PPP3CB (P16298) | HSPA5 (P11021) | | | |
| | PYGB (P11216) | HSPB1 (P04792) | | | |
| | RPS23 (P62266) | HSPD1 (P10809) | | | |
| | RSPH1 (Q8WYR4) | MDH2 (P40926) | | | |
| | SDHD (O14521) | NARS (O43776) | | | |
| | SPTBN1 (Q01082) ⑤ | NDUFS3 (O75489) | | | |
| | SUCLA2 (Q9P2R7) | NTRK2 (Q16620) ② | | | |
| | SUCLG1 (P53597) | PFKL (P17858) | | | |
| | UQCRFS1 (P47985) | PKM (P14618) | | | |
| | YWHAQ (P27348) ② | PKN1 (Q16512) | | | |
| | | PRDX2 (P32119) | | | |
| | | SDHA (P31040) | | | |
| | | SUCLA2 (Q9P2R7) | | | |
| | | TPM1 (P09493) | | | |
| | | TPT1 (P13693) | | | |
| | | TSPAN1 (O60635) | | | |
| | | VWASA (O00534) | | | |

Annexe 6 : Liste des protéines associées à la voie exosomale

Tableau 6 : Liste des protéines associées à la voie exosomale. Protéines associées à la voie exosomale (GO "Exosomes") générée avec des protéines exclusives (diagrammes de Venn) et surreprésentées (Heatmaps) à partir des échantillons (temps par temps) de l'inhibiteur SB431542 vs. véhicule (Figure 44).

| T0 | | T6 h | | T24 h | |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Véhicule | Inhibiteur | Véhicule | Inhibiteur | Véhicule | Inhibiteur |
| RAB11A (P62491) | PYGB (P11216) | EHD1 (Q9H4M9) | PEF1 (Q9UBV8) | CMPK1 (P30085) | AHNAK (Q09666) |
| NARS (O43776) | ATP5A1 (P25705) | FSCN1 (Q16658) | WDR1 (O75083) | HSPA8 (P11142) | FAH (P16930) |
| FLNC (Q14315) | SPTBN1 (Q01082) | HSPD1 (P10809) | GSTA1 (P08263) | HSPA5 (P11021) | NPEPPS (P55786) |
| TUBA4A (P68366) | HSPD1 (P10809) | TSPAN1 (O60635) | YWHAZ (P63104) | FLNC (Q14315) | |
| LCP1 (P13796) | GNAQ (P50148) | HSPB1 (P04792) | SLC44A4 (Q53GD3) | YWHAZ (P63104) | |
| FH (P07954) | YWHAQ (P27348) | HSPA5 (P11021) | PSMB8 (P28062) | MVP (Q14764) | |
| FLNA (P21333) | SUCLA2 (Q9P2R7) | FH (P07954) | AHNAK (Q09666) | GMDS (O60547) | |
| HGS (Q14964) | MVP (Q14764) | ENTPD1 (P49961) | PSMB1 (P20618) | PSMD13 (Q9UNM6) | |
| SYNE1 (Q8NF91) | AHCYL1 (Q43865) | NARS (O43776) | CPVL (Q9H3G5) | | |
| CDC42 (P60953) | CRYZ (Q08257) | MDH2 (P40926) | UGP2 (Q16851) | | |
| EHD3 (Q9NZN3) | CST4 (P01036) | PFKL (P17858) | NID1 (P14543) | | |
| CD9 (P21926) | ARPC3 (O15145) | PRDX2 (P32119) | CAPZB (P47756) | | |
| CBR1 (P16152) | SYAP1 (Q96A49) | CAP1 (Q01518) | GNAQ (P50148) | | |
| ARPC5L (Q9BPX5) | AHCY (P23526) | GPI (P06744) | GLUL (P15104) | | |
| HSD17B10 (Q99714) | PSMA6 (P60900) | CALR (P27797) | FLNC (Q14315) | | |
| QDPR (P09417) | DPYS (Q14117) | PKM (P14618) | MYH3 (P11055) | | |
| MIF (P14174) | ASAH1 (Q13510) | SUCLA2 (Q9P2R7) | AARS (P49588) | | |
| | CFL2 (Q9Y281) | CS (O75390) | PDXK (O00764) | | |
| | PLEC (Q15149) | ANXA13 (P27216) | ATP1B1 (P05026) | | |
| | CCT2 (P78371) | TPM1 (P09493) | RAB35 (Q15286) | | |
| | SEPT2 (Q15019) | COL6A3 (P12111) | RPS14 (P62263) | | |
| | CAPZB (P47756) | PRKAR2A (P13861) | PSMB5 (P28074) | | |
| | AKR1A1 (P14550) | ANXA7 (P20073) | FAH (P16930) | | |
| | LRP2 (P98164) | DBNL (Q9UJU6) | FKBP1A (P62942) | | |
| | HYOU1 (Q9Y4L1) | ATP1B1 (P05026) | RPLP0 (P05388) | | |
| | ATP1A3 (P13637) | ANPEP (P15144) | SLC44A1 (Q8WWI5) | | |
| | GMDS (O60547) | TOM1 (O60784) | PSMD7 (P51665) | | |
| | CAPZA1 (P52907) | UGP2 (Q16851) | SLC9A3R2 (Q15599) | | |
| | FKBP1A (P62942) | PNP (P00491) | RRAS2 (P62070) | | |
| | TBCA (O75347) | GNB2L1 (P63244) | CLIC4 (Q9Y696) | | |
| | RPLP0 (P05388) | RAP2C (Q9Y3L5) | P4HB (P07237) | | |
| | PPP2CA (P67775) | SELENBP1 (Q13228) | ACTN1 (P12814) | | |
| | ECE1 (P42892) | PSMA6 (P60900) | | | |
| | PAFAH1B2 (P68402) | RAP1B (P61224) | | | |
| | DHX9 (Q08211) | HIRA (P54198) | | | |
| | LAP3 (P28838) | PAICS (P22234) | | | |
| | PSMD2 (Q13200) | ATP2B2 (Q01814) | | | |
| | GLUL (P15104) | TCP1 (P17987) | | | |
| | | FLOT1 (O75955) | | | |
| | | UBA52 (P62987) | | | |
| | | RAB1A (P62820) | | | |
| | | ATP1A1 (P05023) | | | |
| | | ATP1A3 (P13637) | | | |
| | | EHD3 (Q9NZN3) | | | |
| | | ACTC1 (P68032) | | | |
| | | TPRG1L (Q5TOD9) | | | |
| | | LRP2 (P98164) | | | |
| | | ANXA5 (P08758) | | | |
| | | FLNB (O75369) | | | |
| | | PDCD6IP (Q8WUM4) | | | |
| | | APRT (P07741) | | | |
| | | RAB8A (P61006) | | | |
| | | CHP1 (Q99653) | | | |
| | | GBE1 (Q04446) | | | |
| | | ATP6V1A (P38606) | | | |
| | | STXBP1 (P61764) | | | |
| | | COX4I1 (P13073) | | | |
| | | ATP6V1G1 (O75348) | | | |
| | | ARF1 (P84077) | | | |
| | | ACAT1 (P24752) | | | |
| | | CAPZA1 (P52907) | | | |
| | | QSOX1 (O00391) | | | |
| | | TUBA1A (Q71U36) | | | |
| | | NPEPPS (P55786) | | | |
| | | PSMA2 (P25787) | | | |
| | | CAPN5 (O15484) | | | |

| | | | | | |
|--|--|------------------|--|--|--|
| | | NAP1L4 (Q99733) | | | |
| | | ACO1 (P21399) | | | |
| | | YES1 (P07947) | | | |
| | | DYNC1H1 (Q14204) | | | |
| | | SRI (P30626) | | | |

Annexe 7 : Liste des protéines surreprésentées de Heatmaps

Tableau 7 : Liste des protéines surreprésentées de Heatmaps. Protéines identifiées dans des clusters spécifiques après l'analyse par le logiciel Perseus des échantillons microglie ganglionnaire vs. microglie connectifs.

| Connectif | Ganglion | | | |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| P07951 (TPM2) | Q9BT88 (SYT11) | P47897 (QARS) | O00217 (NDUFS8) | P17568 (NDUFB7) |
| P30101 (PDIA3) | Q9NX63 (CHCHD3) | Q9P0J1 (PDP1) | O00429 (DNM1L) | Q14964 (RAB39A) |
| Q86XE0 (SNX32) | P22303 (ACHE) | O43301 (HSPA12A) | P56134 (ATP5J2) | Q9UBQ0 (VPS29) |
| P18206 (VCL) | Q9UHW9 (SLC12A6) | Q96AB3 (ISOC2) | Q6SZW1 (SARM1) | O95178 (NDUFB2) |
| O15394 (NCAM2) | Q13423 (NNT) | Q9BWM7 (SFXN3) | P06576 (ATP5B) | Q6KCM7 (SLC25A25) |
| P09936 (UCHL1) | Q8NDT2 (RBM15B) | P09622 (DLD) | P09471 (GNAO1) | P49448 (GLUD2) |
| Q9Y371 (SH3GLB1) | P11021 (HSPA5) | Q4G0N4 (NADK2) | Q92932 (PTPRN2) | P48163 (ME1) |
| P35611 (ADD1) | Q8NFBV4 (ABHD11) | Q14117 (DPYS) | P04844 (RPN2) | Q13557 (CAMK2D) |
| Q9Y4G6 (TLN2) | Q9H4M9 (EHD1) | Q6PIU2 (NCEH1) | P26639 (TARS) | P62258 (YWHAE) |
| P21333 (FLNA) | O95202 (LETM1) | Q3MIX3 (ADCK5) | Q9UL45 (BLOC1S6) | P63241 (EIF5A) |
| P62701 (RPS4X) | Q9UGM6 (WARS2) | P62491 (RAB11A) | Q9UGJ0 (PRKAG2) | P42765 (A2CA2) |
| Q9HBL0 (TNS1) | P22695 (UQCRC2) | P36551 (CPOX) | Q8N468 (MFSD4) | Q9H8H5 (RDH14) |
| Q01082 (SPTBN1) | Q9JUJ6 (DBNL) | Q9BPW8 (NIPSNAP1) | Q02252 (ALDH6A1) | Q8NE86 (MCU) |
| P20073 (ANXA7) | O14531 (DPYSL4) | Q9NS69 (TOMM22) | Q9GZT8 (NIF3L1) | Q6P1Q0 (LETMD1) |
| O94760 (DDAH1) | Q8N3J6 (CADM2) | Q9Y305 (ACOT9) | P46776 (RPL27A) | P04075 (ALDOA) |
| A6NIH7 (UNC119B) | Q9P0J0 (NDUFA13) | P11217 (PYGM) | P05023 (ATP1A1) | Q9UDW1 (UQCR10) |
| Q12955 (ANK3) | P41732 (TSPAN7) | P36542 (ATP5C1) | P31150 (GDI1) | Q02790 (FKBP4) |
| Q00169 (PITPNA) | Q99798 (ACO2) | Q93050 (ATP6V0A1) | Q6NSJ0 (KIAA1161) | Q96DA2 (RAB39B) |
| P00387 (CYB5R3) | Q16891 (IMMT) | Q6NUK1 (SLC25A24) | Q86WB7 (UNC93A) | P50395 (GDI2) |
| P35580 (MYH10) | Q96RL7 (VPS13A) | P51649 (ALDH5A1) | Q9NV17 (ATAD3A) | O95299 (NDUFA10) |
| Q8TAA3 (PSMA8) | Q9UBC2 (EPS15L1) | P53621 (COPA) | Q9Y2Q3 (GSTK1) | P42892 (ECE1) |
| P55087 (AQP4) | Q14204 (DYNC1H1) | P78371 (CCT2) | Q9NR46 (SH3GLB2) | Q15772 (SPEG) |
| Q9Y2W6 (TDRKH) | P11216 (PYGB) | Q16720 (ATP2B3) | Q9BXW7 (CECR5) | P30531 (SLC6A1) |
| P60900 (PSMA6) | Q9H9P8 (L2HGDH) | Q99832 (CCT7) | Q96IX5 (USMG5) | P61421 (ATP6V0D1) |
| P25788 (PSMA3) | P19404 (NDUFV2) | P07954 (FH) | Q10713 (PMPCA) | Q8WVQ1 (CANT1) |
| P62266 (RPS23) | P57103 (SLC8A3) | P51659 (HSD17B4) | P26440 (IVD) | Q14697 (GANAB) |
| P30040 (ERP29) | Q16822 (PCK2) | P18859 (ATP5J) | P21695 (GPD1) | P20591 (ALDH2) |
| P28062 (PSMB8) | Q5HYI7 (MTX3) | P55145 (MANF) | O14967 (CLGN) | O15126 (SCAMP1) |
| Q68DQ2 (CRYBG3) | Q8WZ42 (TTN) | Q99720 (SIGMAR1) | Q9Y251 (HPSE) | Q8NI60 (ADCK3) |
| P30041 (PRDX6) | P21579 (SYT1) | P04080 (CSTB) | P32119 (PRDX2) | Q43776 (NARS) |
| P06576 (ATP5B) | O43149 (ZZEF1) | P42261 (GRIA1) | P48047 (ATP5O) | Q6ZSS7 (MFSD6) |
| Q09666 (AHNAK) | Q07837 (SLC3A1) | O14561 (NDUFAB1) | Q9Y5K8 (ATP6V1D) | P43004 (SLC1A2) |
| O75923 (DYSF) | Q8IZV5 (RDH10) | P50897 (PPT1) | Q01518 (CAP1) | Q9UNW1 (MINPP1) |
| Q96M93 (ADAD1) | P14415 (ATP1B2) | Q9UBF2 (COPG2) | Q12955 (ANK3) | Q9NR19 (ACSS2) |
| Q01484 (ANK2) | P21281 (ATP6V1B2) | Q96EY8 (MMAB) | P80404 (ABAT) | Q96E52 (OMA1) |
| P50148 (GNAQ) | P63010 (AP2B1) | Q9P2R7 (SUCLA2) | P31930 (UQCR1) | Q9BYV1 (AGXT2) |
| Q14764 (MVP) | P04179 (SOD2) | Q9ULD0 (OGDHL) | P54920 (NAPA) | Q9NVH1 (DNAJC11) |
| Q9Y6N5 (SQRLD) | O60706 (ABCC9) | P36543 (ATP6V1E1) | Q99460 (PSMD1) | Q86Y39 (NDUFA11) |
| P49961 (ENTPD1) | Q9HCJ6 (VAT1L) | O75431 (MTX2) | O43865 (AHCYL1) | P21796 (VDAC1) |
| P54132 (BLM) | P36776 (LONP1) | P17987 (TCP1) | O75964 (ATP5L) | O95861 (BPNT1) |
| O75069 (TMCC2) | P49588 (AARS) | P31040 (SDHA) | P09669 (COX6C) | P49902 (NT5C2) |
| Q14376 (GALE) | P10809 (HSPD1) | P48728 (AMT) | P16219 (ACADS) | P36957 (DLST) |
| Q96P15 (SERPINB11) | Q9HGK4 (OPA3) | P22694 (PRKACB) | O43837 (IDH3B) | Q9NPJ3 (ACOT13) |
| P25789 (PSMA4) | Q02127 (DHODH) | Q495T6 (MMEL1) | P00915 (CA1) | Q15102 (PAFAH1B3) |
| Q14315 (FLNC) | O94813 (SLIT2) | O75955 (FLOT1) | Q9UQ16 (DNM3) | Q9NRG7 (SDR39U1) |
| Q9Y2M2 (SSUH2) | P10515 (DIAT) | P14618 (PKM) | P13637 (ATP1A3) | P15104 (GLUL) |
| P08123 (COL1A2) | Q00325 (SLC25A3) | P28331 (NDUFS1) | O95168 (NDUF4) | Q9NV96 (TMEM30A) |
| O00487 (PSMD14) | Q96QK1 (VPS35) | O60503 (ADCY9) | P50502 (ST13) | Q07021 (C1QBP) |
| Q13418 (ILK) | Q9Y4W6 (AFG3L2) | Q13409 (DYNC1I2) | P17050 (NAGA) | P49257 (LMAN1) |
| P09493 (TPM1) | P16519 (PCSK2) | P62191 (PSMC1) | Q04837 (SSBP1) | O15484 (CAPN5) |
| P55786 (NPEPPS) | Q16740 (CLPP) | Q6UXV4 (APOOL) | P52824 (DGKQ) | P45880 (VDAC2) |
| Q9HAV0 (GNB4) | Q16851 (UGP2) | P38646 (HSPA9) | P14927 (UQCRB) | P42704 (LRPPRC) |
| Q99470 (SDF2) | Q9UIQ6 (LNPEP) | Q14974 (KPNB1) | O75947 (ATP5H) | Q9UQM7 (CAMK2A) |
| P11277 (SPTB) | Q8NCN5 (PDP1) | P10620 (MGST1) | P47985 (UQCRFS1) | Q9HD34 (LYRM4) |
| P28289 (TMOD1) | P43304 (GPD2) | P17752 (TPH1) | Q99643 (SDHC) | Q9NX40 (OCIAD1) |
| P17980 (PSMC3) | P39656 (DDOST) | P53597 (SUCLG1) | Q9NNW7 (TXNRD2) | Q9H0C2 (SLC25A31) |
| Q13813 (SPTAN1) | O75439 (PMPCB) | O15143 (ARPC1B) | Q99714 (HSD17B10) | Q9Y6C9 (MTCH2) |
| P62263 (RPS14) | Q9UGV2 (NDRG3) | P36578 (RPL4) | P05026 (ATP1B1) | Q8WUM4 (PDCD6IP) |
| P23396 (RPS3) | P08236 (GUSB) | Q9Y6R1 (SLC4A4) | P28072 (PSMB6) | Q92734 (TFG) |
| Q16620 (NTRK2) | P08574 (CYC1) | Q6U841 (SLC4A10) | Q8IYU8 (MICU2) | O15217 (GSTA4) |
| Q9NUQ9 (FAM49B) | Q05193 (DNM1) | Q8N2U0 (TMEM256) | Q16620 (NTRK2) | Q9UI09 (NDUFA12) |
| P07355 (ANXA2) | P49327 (FASN) | Q5R314 (TTC38) | P51687 (SUOX) | P61019 (RAB2A) |
| P09429 (HMGB1) | Q5JRX3 (PITRM1) | P07900 (HSP90AA1) | P04406 (GAPDH) | Q9Y371 (SH3GLB1) |
| Q14165 (MLEC) | Q6NVY1 (HIBCH) | Q04446 (GBE1) | P38606 (ATP6V1A) | Q15771 (RAB30) |
| O75688 (PPM1B) | Q86WG5 (SBF2) | Q99805 (TM9SF2) | P20674 (COX5A) | P53396 (ACLY) |
| Q9YUJ6 (DBNL) | Q02978 (SLC25A11) | Q9BXP6 (MICU1) | P61764 (STXB1) | P28838 (LAP3) |
| Q9HC10 (OTOF) | Q9Y4L1 (HYOU1) | Q13200 (PSMD2) | P13073 (COX4I1) | P07203 (GPX1) |
| O75954 (TSPAN9) | P40926 (MDH2) | Q9HAS3 (SLC28A3) | O75348 (ATP6V1G1) | Q7K2N9 (COX15) |

| | | | | |
|-------------------|------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| P05388 (RPLP0) | P35573 (AGL) | P43897 (TSFM) | P51148 (RAB5C) | P04843 (RPN1) |
| Q9UHY7 (ENOPH1) | O75746 (SLC25A12) | P35626 (ADRBK2) | Q9Y281 (CFL2) | P05549 (TFAP2A) |
| Q6P1M3 (LLGL2) | Q9ULV4 (CORO1C) | Q99747 (NAPG) | P62826 (RAN) | P13591 (NCAM1) |
| Q02878 (RPL6) | P30042 (102724023, C21orf33) | Q9H3G5 (CPVL) | Q16795 (NDUFA9) | O75251 (NDUFS7) |
| P35749 (MYH11) | Q8IZS8 (CACNA2D3) | Q9UM22 (EPDR1) | P22830 (FECH) | Q9UP95 (SLC12A4) |
| Q14210 (LY6D) | Q9UGQ2 (CACFD1) | O95757 (HSPA4L) | P07737 (PFN1) | Q12931 (TRAP1) |
| Q14203 (DCTN1) | O43242 (PSMD3) | Q5FVE4 (ACSBG2) | O43772 (SLC25A20) | P22309 (UGT1A1) |
| P02549 (SPTA1) | Q96A49 (SYAP1) | P54136 (RARS) | Q9H9B4 (SFXN1) | P15428 (HPGD) |
| P08263 (GSTA1) | Q15811 (ITSN1) | P49821 (NDUFV1) | P50993 (ATP1A2) | P24534 (EEF1B2) |
| Q15599 (SLC9A3R2) | P30038 (ALDH4A1) | P54819 (AK2) | Q9NX14 (NDUFB11) | P27797 (CALR) |
| P12694 (BCKDHA) | P06280 (GLA) | P34059 (GALNS) | O75489 (NDUFS3) | P40123 (CAP2) |
| P61158 (ACTR3) | P11177 (PDHB) | O15260 (SURF4) | P49411 (TUFM) | Q99963 (SH3GL3) |
| P08865 (RPSA) | P00367 (GLUD1) | Q8WWI5 (SLC44A1) | P51553 (IDH3G) | P43034 (PAFAH1B1) |
| O00533 (CHL1) | Q9NQR4 (NIT2) | O75600 (GCAT) | P25705 (ATP5A1) | P49368 (CCT3) |
| P48556 (PSMD8) | O75131 (CPNE3) | Q8NHP8 (PLBD2) | Q9H1K1 (ISCU) | O00330 (PDHX) |
| P04075 (ALDOA) | Q14254 (FLOT2) | P17858 (PFKL) | P00505 (GOT2) | Q16799 (RTN1) |
| Q8NFZ5 (TNIP2) | Q13748 (TUBA3D, TUBA3C) | O75880 (SCO1) | Q969S9 (GFM2) | P40939 (HADHA) |
| Q86YT5 (SLC13A5) | Q01469 (FABP5) | P52789 (HK2) | Q9H2X9 (SLC12A5) | P20807 (CAPN3) |
| P18124 (RPL7) | O43252 (PAPSS1) | P23786 (CPT2) | Q02318 (CYP27A1) | P83111 (LACTB) |
| Q7Z5P4 (HSD17B13) | O95747 (OXR1) | O75306 (NDUFS2) | O95831 (AIFM1) | |
| P36959 (GMPR) | Q9UBX3 (SLC25A10) | Q9NSY2 (STARD5) | P0C7P0 (CISD3) | |
| P35613 (BSG) | Q6P587 (FAHD1) | O75311 (GLRA3) | P49755 (TMED10) | |
| P35222 (CTNNA1) | Q02218 (OGDH) | O43760 (SYNGR2) | P46459 (NSF) | |
| P27361 (MAPK3) | P30519 (HMOX2) | P04181 (OAT) | Q16849 (PTPRN) | |

Annexe 8 : Droits d'auteur des images

Figure 1 :

MDPI and ACS Style

Abeyasinghe, H.C.S.; Phillips, E.L.; Chin-Cheng, H.; Beart, P.M.; Roulston, C.L. Modulating Astrocyte Transition after Stroke to Promote Brain Rescue and Functional Recovery: Emerging Targets Include Rho Kinase. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 288

This is an open access article distributed under the [Creative Commons Attribution License](#) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited (CC BY 4.0).

Figure 2 :

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 01, 2018

This Agreement between INSERM U1192 -- Antonella Raffo Romero ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|---|
| License Number | 4454190019184 |
| License date | Oct 22, 2018 |
| Licensed Content Publisher | Springer Nature |
| Licensed Content Publication | Nature Reviews Neuroscience |
| Licensed Content Title | Neuronal cell-type classification: challenges, opportunities and the path forward |
| Licensed Content Author | Hongkui Zeng, Joshua R. Sanes |
| Licensed Content Date | Aug 3, 2017 |
| Licensed Content Volume | 18 |
| Licensed Content Issue | 9 |
| Type of Use | Thesis/Dissertation |
| Requestor type | academic/university or research institute |
| Format | print and electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| High-res required | no |
| Will you be translating? | no |
| Circulation/distribution | <501 |
| Author of this Springer Nature content | no |
| Title | Implication de la signalisation ALK4/5 dans le dialogue entre les neurones et les cellules microgliales chez la sangsue <i>Hirudo medicinalis</i> |
| Institution name | université science et technologie de lille |
| Expected presentation date | Dec 2018 |
| Portions | graphic representation of the new neurone classification figure 1 |
| Requestor Location | INSERM U1192 Bât SN3, 1er étage, porte 109 Villeneuve d'ascq, haut de france 59655 France Attn: INSERM U1192 |
| Billing Type | Invoice |

Billing Address

INSERM U1192
Bât SN3, 1er étage, porte 109

Villeneuve d'ascq, France 59655
Attn: INSERM U1192

Figure 3 :

Copyright © 2015 Demetrius, Magistretti and Pellerin. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Figure 4 :

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 02, 2018

This Agreement between INSERM U1192 -- Antonella Raffo Romero ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|--|
| License Number | 4454190562356 |
| License date | Oct 22, 2018 |
| Licensed Content Publisher | Springer Nature |
| Licensed Content Publication | Nature Reviews Immunology |
| Licensed Content Title | Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease |
| Licensed Content Author | Qingyun Li, Ben A. Barres |
| Licensed Content Date | Nov 20, 2017 |
| Licensed Content Volume | 18 |
| Licensed Content Issue | 4 |
| Type of Use | Thesis/Dissertation |
| Requestor type | academic/university or research institute |
| Format | print and electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| High-res required | no |
| Will you be translating? | no |
| Circulation/distribution | <501 |
| Author of this Springer Nature content | no |
| Title | Implication de la signalisation ALK4/5 dans le dialogue entre les neurones et les cellules microgliales chez la sangsue Hirudo medicinalis |
| Institution name | université science et technologie de lille |
| Expected presentation date | Dec 2018 |
| Order reference number | 5 |
| Portions | microglial cell origin description figure 2 |
| Requestor Location | INSERM U1192 |

Bât SN3, 1er étage, porte 109

Villeneuve d'ascq, haut de france 59655
France
Attn: INSERM U1192

Billing Type

Invoice

Billing Address

INSERM U1192
Bât SN3, 1er étage, porte 109

Villeneuve d'ascq, France 59655
Attn: INSERM U1192

Figure 5 :

Copyright © 2013 Sierra, Abiega, Shahraz and Neumann. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

Figure 6 :

Annual Reviews, Inc LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Dec 02, 2018

This is a License Agreement between INSERM U1192 -- Antonella Raffo Romero ("You") and Annual Reviews, Inc ("Annual Reviews, Inc") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Annual Reviews, Inc, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

| | |
|---|--|
| License Number | 4480730607531 |
| License date | Oct 22, 2018 |
| Licensed content publisher | Annual Reviews, Inc |
| Licensed content title | Annual review of immunology |
| Licensed content date | Jan 1, 1983 |
| Type of Use | Thesis/Dissertation |
| Requestor type | Academic institution |
| Format | Print, Electronic |
| Portion | chart/graph/table/figure |
| Number of charts/graphs/tables/figures | 1 |
| The requesting person/organization is: | antonella raffo |
| Title or numeric reference of the portion(s) | Figure 2 |
| Title of the article or chapter the portion is from | Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration |
| Editor of portion(s) | ANNUAL REVIEWS |
| Author of portion(s) | Marco Colonna and Oleg Butovsky |
| Volume of serial or monograph. | 35:441-468 |
| Page range of the portion | 8 |
| Publication date of portion | February 9, 2017 |

| | |
|---|---|
| Rights for | Main product |
| Duration of use | Life of current edition |
| Creation of copies for the disabled | no |
| With minor editing privileges | no |
| For distribution to | Worldwide |
| In the following language(s) | Original language of publication |
| With incidental promotional use | no |
| The lifetime unit quantity of new product | Up to 499 |
| Title | Implication de la signalisation ALK4/5 dans le dialogue entre les neurones et les cellules microgliales chez la sangsue <i>Hirudo medicinalis</i> |
| Institution name | université science et technologie de lille |
| Expected presentation date | Dec 2018 |
| Order reference number | 4 |
| Billing Type | Invoice |
| Billing Address | INSERM U1192 Bât SN3, 1er étage, porte 109 Villeneuve d'ascq, France 59655 Attn: INSERM U1192 |
| Total (may include CCC user fee) | 0.00 USD |

Terms and Conditions

Figure 7 :

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 01, 2018

This Agreement between INSERM U1192 -- Antonella Raffo Romero ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

| | |
|--------------------------------|---|
| License Number | 4460420659935 |
| License date | Nov 01, 2018 |
| Licensed Content Publisher | Elsevier |
| Licensed Content Publication | Immunity |
| Licensed Content Title | Myeloid Cells in the Central Nervous System |
| Licensed Content Author | Jasmin Herz,Anthony J. Filiano,Ashtyn Smith,Nir Yogev,Jonathan Kipnis |
| Licensed Content Date | Jun 20, 2017 |
| Licensed Content Volume | 46 |
| Licensed Content Issue | 6 |
| Licensed Content Pages | 14 |
| Start Page | 943 |
| End Page | 956 |
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Intended publisher of new work | other |
| Portion | figures/tables/illustrations |

| | |
|--|---|
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| Format | both print and electronic |
| Are you the author of this Elsevier article? | No |
| Will you be translating? | No |
| Order reference number | 6 |
| Original figure numbers | Figure 6: Disfonctionnement de cellules microgliales dans leur rôle vers les neurones.(Herz et al., 2017) |
| Title of your thesis/dissertation | Implication de la signalisation ALK4/5 dans le dialogue entre les neurones et les cellules microgliales chez la sangsue <i>Hirudo medicinalis</i> |
| Publisher of new work | université science et technologie de lille |
| Expected completion date | Dec 2018 |
| Estimated size (number of pages) | 1 |
| Requestor Location | INSERM U1192 Bât SN3, 1er étage, porte 109 Villeneuve d'ascq, haut de france 59655 France Attn: INSERM U1192 |
| Publisher Tax ID | GB 494 6272 12 |

Figure 8 :

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 01, 2018

This Agreement between INSERM U1192 -- Antonella Raffo Romero ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|---|
| License Number | 4460421335484 |
| License date | Nov 01, 2018 |
| Licensed Content Publisher | Springer Nature |
| Licensed Content Publication | Nature Immunology |
| Licensed Content Title | Family ties among CNS macrophages |
| Licensed Content Author | Melanie Greter |
| Licensed Content Date | Jun 21, 2016 |
| Licensed Content Volume | 17 |
| Licensed Content Issue | 7 |
| Type of Use | Thesis/Dissertation |
| Requestor type | academic/university or research institute |
| Format | print and electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| High-res required | no |
| Will you be translating? | no |
| Circulation/distribution | <501 |
| Author of this Springer Nature content | no |

| | |
|----------------------------|---|
| Title | Implication de la signalisation ALK4/5 dans le dialogue entre les neurones et les cellules microgliales chez la sangsue <i>Hirudo medicinalis</i> |
| Institution name | université science et technologie de lille |
| Expected presentation date | Dec 2018 |
| Order reference number | 5 |
| Portions | Figure 5: Localisation et signature génétique de cellules microgliales et des macrophages SNC |
| Requestor Location | INSERM U1192 Bât SN3, 1er étage, porte 109 Villeneuve d'ascq, haut de france 59655 France Attn: INSERM U1192 |
| Billing Type | Invoice |
| Billing Address | INSERM U1192 Bât SN3, 1er étage, porte 109 Villeneuve d'ascq, France 59655 Attn: INSERM U1192 |

Figure 10 :

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 02, 2018

This Agreement between INSERM U1192 -- Antonella Raffo Romero ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

| | |
|---------------------------------------|--|
| License Number | 4480811351608 |
| License date | Dec 02, 2018 |
| Licensed Content Publisher | John Wiley and Sons |
| Licensed Content Publication | Journal of Cellular Biochemistry |
| Licensed Content Title | LTBPs, more than just an escort service |
| Licensed Content Author | Daniel B. Rifkin, Vesna Todorovic |
| Licensed Content Date | Jan 5, 2012 |
| Licensed Content Volume | 113 |
| Licensed Content Issue | 2 |
| Licensed Content Pages | 9 |
| Type of use | Dissertation/Thesis |
| Requestor type | University/Academic |
| Format | Print and electronic |
| Portion | Figure/table |
| Number of figures/tables | 1 |
| Original Wiley figure/table number(s) | Figure 2. TGF- β -LTBP assembly, processing, and activation After dimerization in the endoplasmic reticulum, pro-TGFs molecules form disulfide bonds to LTBP molecules early in the secretory pathway. In the trans-Golgi, furin-like enzymes process the pro- |

TGF- β yielding mature TGF- β , the TGF β propeptide (LAP), and an LTBP. This complex is called the large latent complex (LLC). When complexed with LAP, TGF- β cannot bind to its receptor. The LLC is secreted, binds to matrix components, and the latent TGF- β is activated by proteases/integrins that modify LAP or/and LTBP. The liberated TGF- β then binds to its receptor.

| | |
|-------------------------------------|---|
| Will you be translating? | No |
| Title of your thesis / dissertation | Implication de la signalisation ALK4/5 dans le dialogue entre les neurones et les cellules microgliales chez la sangsue <i>Hirudo medicinalis</i> |
| Expected completion date | Dec 2018 |
| Expected size (number of pages) | 1 |
| Requestor Location | INSERM U1192 Bât SN3, 1er étage, porte 109 Villeneuve d'ascq, haut de france 59655 France Attn: INSERM U1192 |
| Publisher Tax ID | EU826007151 |

Figure 11 :

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Dec 02, 2018

This Agreement between INSERM U1192 -- Antonella Raffo Romero ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|--|
| License Number | 4463060736141 |
| License date | Nov 06, 2018 |
| Licensed Content Publisher | Springer Nature |
| Licensed Content Publication | Nature Reviews Endocrinology |
| Licensed Content Title | BMP signalling in skeletal development, disease and repair |
| Licensed Content Author | Valerie S. Salazar, Laura W. Gamer, Vicki Rosen |
| Licensed Content Date | Feb 19, 2016 |
| Licensed Content Volume | 12 |
| Licensed Content Issue | 4 |
| Type of Use | Thesis/Dissertation |
| Requestor type | academic/university or research institute |
| Format | print and electronic |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| High-res required | no |
| Will you be translating? | no |
| Circulation/distribution | <501 |
| Author of this Springer Nature content | no |
| Title | Implication de la signalisation ALK4/5 dans le dialogue entre les neurones et les cellules |

| | |
|----------------------------|--|
| | microgliales chez la sangsue Hirudo medicinalis |
| Institution name | université science et technologie de lille |
| Expected presentation date | Dec 2018 |
| Order reference number | 6 |
| Portions | Figure 2: Fundamental mechanisms of canonical BMP superfamily signalling. |
| Requestor Location | INSERM U1192 Bât SN3, 1er étage, porte 109 Villeneuve d'ascq, haut de france 59655 France Attn: INSERM U1192 |
| Billing Type | Invoice |
| Billing Address | INSERM U1192 Bât SN3, 1er étage, porte 109 Villeneuve d'ascq, France 59655 Attn: INSERM U1192 |
| Total | 0.00 EUR |

Figure 12 :

© György, B., Szabó, T.G., Pásztói, M. et al.2011

Figure 13 :

Copyright: © 2012 Frühbeis, Fröhlich and Krämer-Albers. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution Non Commercial License](#), which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited.

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions

Springer Nature Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Where **print only** permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.
3. Permission granted **free of charge** for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where '**reuse in a dissertation/thesis**' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).
6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

Appendix — Acknowledgements:

| | | |
|---|---|---|
| <p>For Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]</p> <p>For Advance Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]</p> <p>For Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]</p> <p>Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies: Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION(Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]</p> <p>For Advance Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]</p> <p>For Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)</p> | <p>Journal</p> <p>Online</p> <p>Book</p> | <p>Content:</p> <p>papers:</p> <p>Adaptations/Translations:</p> <p>Publication papers:</p> <p>content:</p> |
|---|---|---|

Other Conditions:

Version 1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

TERMS AND CONDITIONS

The following terms are individual to this publisher:

None

Other Terms and Conditions:

Please attribute the following: Reproduced with permission from the Annual Review of Immunology, Volume 35 © 2017 by Annual Reviews, <http://www.annualreviews.org>

STANDARD TERMS AND CONDITIONS

1. Description of Service; Defined Terms. This Republication License enables the User to obtain licenses for republication of one or more copyrighted works as described in detail on the relevant Order Confirmation (the "Work(s)"). Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") grants licenses through the Service on behalf of the rightsholder identified on the Order Confirmation (the "Rightsholder"). "Republication", as used herein, generally means the inclusion of a Work, in whole or in part, in a new work or works, also as described on the Order Confirmation. "User", as used herein, means the person or entity making such republication.

2. The terms set forth in the relevant Order Confirmation, and any terms set by the Rightsholder with respect to a particular Work, govern the terms of use of Works in connection with the Service. By using the Service, the person transacting for a republication license on behalf of the User represents and warrants that he/she/it (a) has been duly authorized by the User to accept, and hereby does accept, all such terms and conditions on behalf of User, and (b) shall inform User of all such terms and conditions. In the event such person is a "freelancer" or other third party independent of User and CCC, such party shall be deemed jointly a "User" for purposes of these terms and conditions. In any event, User shall be deemed to have accepted and agreed to all such terms and conditions if User republishes the Work in any fashion.

3. Scope of License; Limitations and Obligations.

3.1 All Works and all rights therein, including copyright rights, remain the sole and exclusive property of the Rightsholder. The license created by the exchange of an Order Confirmation (and/or any invoice) and payment by User of the full amount set forth on that document includes only those rights expressly set forth in the Order Confirmation and in these terms and conditions, and conveys no other rights in the Work(s) to User. All rights not expressly granted are hereby reserved.

3.2 General Payment Terms: You may pay by credit card or through an account with us payable at the end of the month. If you and we agree that you may establish a standing account with CCC, then the following terms apply: Remit Payment to: Copyright Clearance Center, 29118 Network Place, Chicago, IL 60673-1291. Payments Due: Invoices are payable upon their delivery to you (or upon our notice to you that they are available to you for downloading). After 30 days, outstanding amounts will be subject to a service charge of 1-1/2% per month or, if less, the maximum rate allowed by applicable law. Unless otherwise specifically set forth in the Order Confirmation or in a separate written agreement signed by CCC, invoices are due and payable on "net 30" terms. While User may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the Order Confirmation, the license is automatically revoked and is null and void, as if it had never been issued, if complete payment for the license is not received on a timely basis either from User directly or through a payment agent, such as a credit card company.

3.3 Unless otherwise provided in the Order Confirmation, any grant of rights to User (i) is "one-time" (including the editions and product family specified in the license), (ii) is non-exclusive and non-transferable and (iii) is subject to any and all limitations and restrictions (such as, but not limited to, limitations on duration of use or circulation) included in the Order Confirmation or invoice and/or in these terms and conditions. Upon completion of the licensed use, User shall either secure a new permission for further use of the Work(s) or immediately cease any new use of the Work(s) and shall render inaccessible (such as by deleting or by removing or severing links or other locators) any further copies of the Work (except for copies printed on paper in accordance with this license and still in User's stock at the end of such period).

3.4 In the event that the material for which a republication license is sought includes third party materials (such as photographs, illustrations, graphs, inserts and similar materials) which are identified in such material as having been used by permission, User is responsible for identifying, and seeking separate licenses (under this Service or otherwise) for, any of such third party materials; without a separate license, such third party materials may not be used.

3.5 Use of proper copyright notice for a Work is required as a condition of any license granted under the Service. Unless otherwise provided in the Order Confirmation, a proper copyright notice will read substantially as follows: "Republished with permission of [Rightsholder's name], from [Work's title, author, volume, edition number and year of copyright]; permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc." Such notice must be provided in a reasonably legible font size and must be placed either immediately adjacent to the Work as used (for example, as part of a by-line or footnote but not as a separate electronic link) or in the place where substantially all other credits or notices for the new work containing the republished Work are located. Failure to include the required notice results in loss to the Rightsholder and CCC, and the User shall be liable to pay liquidated damages for each such failure equal to twice the use fee specified in the Order Confirmation, in addition to the use fee itself and any other fees and charges specified.

3.6 User may only make alterations to the Work if and as expressly set forth in the Order Confirmation. No Work may be used in any way that is defamatory, violates the rights of third parties (including such third parties' rights of copyright, privacy, publicity, or other tangible or intangible property), or is otherwise illegal, sexually explicit or obscene. In addition, User may not conjoin a Work with any other material that may result in damage to the reputation of the Rightsholder. User agrees to inform CCC if it becomes aware of any infringement of any rights in a Work and to cooperate with any reasonable request of CCC or the Rightsholder in connection therewith.

4. Indemnity. User hereby indemnifies and agrees to defend the Rightsholder and CCC, and their respective employees and directors, against all claims, liability, damages, costs and expenses, including legal fees and expenses, arising out of any use of a Work beyond the scope of the rights granted herein, or any use of a Work which has been altered in any unauthorized way by User, including claims of defamation or infringement of rights of copyright, publicity, privacy or other tangible or intangible property.

5. Limitation of Liability. UNDER NO CIRCUMSTANCES WILL CCC OR THE RIGHTSHOLDER BE LIABLE FOR ANY DIRECT, INDIRECT, CONSEQUENTIAL OR INCIDENTAL DAMAGES (INCLUDING WITHOUT LIMITATION DAMAGES FOR LOSS OF BUSINESS PROFITS OR INFORMATION, OR FOR BUSINESS INTERRUPTION) ARISING OUT OF THE USE OR INABILITY TO USE A WORK, EVEN IF ONE OF THEM HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. In any event, the total liability of the Rightsholder and CCC (including their respective employees and directors) shall not exceed the total amount actually paid by User for this license. User assumes full liability for the actions and omissions of its principals, employees, agents, affiliates, successors and assigns.

6. Limited Warranties. THE WORK(S) AND RIGHT(S) ARE PROVIDED "AS IS". CCC HAS THE RIGHT TO GRANT TO USER THE RIGHTS

GRANTED IN THE ORDER CONFIRMATION DOCUMENT. CCC AND THE RIGHTSHOLDER DISCLAIM ALL OTHER WARRANTIES RELATING TO THE WORK(S) AND RIGHT(S), EITHER EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING WITHOUT LIMITATION IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. ADDITIONAL RIGHTS MAY BE REQUIRED TO USE ILLUSTRATIONS, GRAPHS, PHOTOGRAPHS, ABSTRACTS, INSERTS OR OTHER PORTIONS OF THE WORK (AS OPPOSED TO THE ENTIRE WORK) IN A MANNER CONTEMPLATED BY USER; USER UNDERSTANDS AND AGREES THAT NEITHER CCC NOR THE RIGHTSHOLDER MAY HAVE SUCH ADDITIONAL RIGHTS TO GRANT.

7. Effect of Breach. Any failure by User to pay any amount when due, or any use by User of a Work beyond the scope of the license set forth in the Order Confirmation and/or these terms and conditions, shall be a material breach of the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions. Any breach not cured within 30 days of written notice thereof shall result in immediate termination of such license without further notice. Any unauthorized (but licensable) use of a Work that is terminated immediately upon notice thereof may be liquidated by payment of the Rightsholder's ordinary license price therefor; any unauthorized (and unlicensable) use that is not terminated immediately for any reason (including, for example, because materials containing the Work cannot reasonably be recalled) will be subject to all remedies available at law or in equity, but in no event to a payment of less than three times the Rightsholder's ordinary license price for the most closely analogous licensable use plus Rightsholder's and/or CCC's costs and expenses incurred in collecting such payment.

8. Miscellaneous.

8.1 User acknowledges that CCC may, from time to time, make changes or additions to the Service or to these terms and conditions, and CCC reserves the right to send notice to the User by electronic mail or otherwise for the purposes of notifying User of such changes or additions; provided that any such changes or additions shall not apply to permissions already secured and paid for.

8.2 Use of User-related information collected through the Service is governed by CCC's privacy policy, available online here: <http://www.copyright.com/content/cc3/en/tools/footer/privacypolicy.html>.

8.3 The licensing transaction described in the Order Confirmation is personal to User. Therefore, User may not assign or transfer to any other person (whether a natural person or an organization of any kind) the license created by the Order Confirmation and these terms and conditions or any rights granted hereunder; provided, however, that User may assign such license in its entirety on written notice to CCC in the event of a transfer of all or substantially all of User's rights in the new material which includes the Work(s) licensed under this Service.

8.4 No amendment or waiver of any terms is binding unless set forth in writing and signed by the parties. The Rightsholder and CCC hereby object to any terms contained in any writing prepared by the User or its principals, employees, agents or affiliates and purporting to govern or otherwise relate to the licensing transaction described in the Order Confirmation, which terms are in any way inconsistent with any terms set forth in the Order Confirmation and/or in these terms and conditions or CCC's standard operating procedures, whether such writing is prepared prior to, simultaneously with or subsequent to the Order Confirmation, and whether such writing appears on a copy of the Order Confirmation or in a separate instrument.

8.5 The licensing transaction described in the Order Confirmation document shall be governed by and construed under the law of the State of New York, USA, without regard to the principles thereof of conflicts of law. Any case, controversy, suit, action, or proceeding arising out of, in connection with, or related to such licensing transaction shall be brought, at CCC's sole discretion, in any federal or state court located in the County of New York, State of New York, USA, or in any federal or state court whose geographical jurisdiction covers the location of the Rightsholder set forth in the Order Confirmation. The parties expressly submit to the personal jurisdiction and venue of each such federal or state court. If you have any comments or questions about the Service or Copyright Clearance Center, please contact us at 978-750-8400 or send an e-mail to info@copyright.com.

v 1.1

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Résumé

Implication de la signalisation ALK4/5 dans le dialogue entre les neurones et les cellules microgliales chez la sangsue *Hirudo medicinalis*

Dans le système nerveux central (SNC), toutes les activités neuronales sont sous l'influence des cellules gliales environnantes, incluant notamment les cellules microgliales. Ces cellules immunitaires résidentes du SNC régulent l'état neuroinflammatoire, si important dans les maladies neurodégénératives. Dans la microglie, les récepteurs du TGF- β de type I (ALK5) et de type II ont récemment été décrits comme une signature spécifique par rapport aux macrophages méningés ou infiltrants depuis le sang, permettant la maintenance/maturation de la microglie. Ces récepteurs sont également utilisés par les neurones en développement sous l'influence de membres de la famille TGF- β , incluant plusieurs GDFs (facteurs de croissance et de différenciation). C'est pourquoi, cette signalisation ALK4/5 a été étudiée dans le dialogue entre cellules microgliales et neurones chez la sangsue *H. medicinalis*. La sangsue médicinale est un modèle de neurobiologie qui, par sa structure nerveuse intéressante, offre la possibilité d'étudier les interactions entre sous-populations microgliales et neurones. Les résultats ont montré que les neurones et la microglie utilisent tous les deux la signalisation ALK4/5 dépendamment d'un membre de la famille TGF- β , appelé nGDF, pour maintenir des échanges mutuels après une lésion axonale. En effet, une libération neuronale immédiate de nGDF après une blessure axonale permet le recrutement précoce de microglie ALK4/5⁺ au point de la lésion tandis que, plus tardivement, la production de nGDF dans des cellules microgliales active de façon paracrine les neurones ALK4/5⁺. Ce second temps de dialogue permet aux neurones d'induire la production d'autres signaux chimiotactiques et ainsi maintenir l'accumulation de la microglie. Dans leur ensemble, les résultats permettent un nouvel aperçu de la compréhension de la voie ALK4/5 en tant que signal régulateur guidant une mobilisation chronologique correcte du recrutement de la microglie dans un cerveau adulte capable de régénération axonale. Les résultats ouvrent la perspective d'une telle étude chez les mammifères adultes afin de préciser la pertinence de ce dialogue dans le cerveau soumis à des lésions accidentelles ou pathologiques.

Mots clés: Dialogue Microglie-Neurones ; Signalisation TGF- β ; Sangsue *Hirudo Medicinalis*; Régénération axonale ; Neuro-Protéomique.

Summary

Involvement of ALK4/5 signaling in the crosstalk between neurons and microglial cells in the leech *Hirudo medicinalis*

In the central nervous system (CNS), all neuronal activities are under the influence of surrounding glial cells, including microglial cells. These resident CNS immune cells regulate the neuroinflammatory state, so important in neurodegenerative diseases. In microglia, TGF- β type I (ALK5) and type II receptors have recently been described as a specific signature compared to meningeal or infiltrating macrophages from the blood, allowing maintenance/maturation of microglia. These receptors are also used by developing neurons under the influence of members of the TGF- β family, including several GDFs (growth and differentiation factors). Therefore, this ALK4/5 signaling was studied in the crosstalk between microglial cells and neurons in the *H. medicinalis* leech. The medicinal leech is a model of neurobiology that, through its interesting nervous structure, offers the possibility of studying the interactions between microglial subpopulations and neurons. The results showed that both neurons and microglia use ALK4/5 signaling, depending on a member of the TGF- β family, called nGDF, to maintain mutual exchanges after axonal injury. Indeed, immediate neuronal release of nGDF after axonal injury allows early recruitment of ALK4/5⁺ microglia at the point of injury while, later, production of nGDF in microglial cells paracrine-activated ALK4/5⁺ neurons. This second crosstalk time allows the neurons to induce the production of other chemotactic signals and thus maintain the accumulation of microglia. Together, the results provide a new insight into the understanding of the ALK4/5 pathway as a regulatory signal guiding correct timing of recruitment of microglia in an adult brain capable of axonal regeneration. The results open up the prospect of such a study in adult mammals to clarify the relevance of this dialogue in the brain subjected to accidental or pathological lesions.

Keywords: Crosstalk Microglia-Neurons; TGF- β signaling; Leech *Hirudo Medicinalis*; Axonal regeneration; Neuro-Proteomics.