



**HAL**  
open science

# Optimisation des effets neuroprotecteurs de l'érythropoïétine par l'augmentation de l'expression neuronale de son récepteur cible : application à un modèle de status epilepticus chez le rat.

Pascal Sanchez

► **To cite this version:**

Pascal Sanchez. Optimisation des effets neuroprotecteurs de l'érythropoïétine par l'augmentation de l'expression neuronale de son récepteur cible : application à un modèle de status epilepticus chez le rat.. Physiologie [q-bio.TO]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2008. Français. NNT: . tel-00368301

**HAL Id: tel-00368301**

**<https://theses.hal.science/tel-00368301>**

Submitted on 16 Mar 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE présentée

devant l'UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

pour l'obtention du DIPLOME DE DOCTORAT  
(arrêté du 7 août 2006)

présentée et soutenue publiquement le 25 novembre 2008 par

**Pascal E. SANCHEZ**

**Optimisation des effets neuroprotecteurs de  
l'érythropoïétine par l'augmentation de  
l'expression neuronale de son récepteur cible:  
Application à un modèle de Status Epilepticus chez le rat.**



Directeurs de thèse: Dr. Laurent BEZIN & Pr. Jean-Marc PEQUIGNOT

**JURY :**

M. le Pr. Philippe RYVLIN,	Président
M. le Pr. Mohamed JABER,	Rapporteur
M. le Pr. Jean MARIANI	Rapporteur
M. le Dr. Jean-Jacques RISSO,	Examineur
M. le Pr. Jean-Marc PEQUIGNOT	Directeur de thèse
M. le Dr. Laurent BEZIN	Directeur de thèse

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I

### **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil Scientifique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Secrétaire Général

### **M. le Professeur L. COLLET**

M. le Professeur J.F. MORNEX

M. le Professeur J. LIETO

M. le Professeur D. SIMON

M. G. GAY

### **SECTEUR SANTE**

#### **Composantes**

UFR de Médecine Lyon R.T.H. Laënnec

UFR de Médecine Lyon Grange-Blanche

UFR de Médecine Lyon-Nord

UFR de Médecine Lyon-Sud

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur P. COCHAT

Directeur : M. le Professeur X. MARTIN

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : M. le Professeur F.N. GILLY

Directeur : M. O. ROBIN

Directeur : M. le Professeur F. LOCHER

Institut Techniques de Réadaptation

Directeur : M. le Professeur MATILLON

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. FARGE

### **SECTEUR SCIENCES**

#### **Composantes**

UFR de Physique

UFR de Biologie

UFR de Mécanique

UFR de Génie Electrique et des Procédés

UFR Sciences de la Terre

UFR de Mathématiques

UFR d'Informatique

UFR de Chimie Biochimie

UFR STAPS

Observatoire de Lyon

Institut des Sciences et des Techniques de l'Ingénieur de Lyon

IUT A

IUT B

Institut de Science Financière et d'Assurance

Directeur : Mme. le Professeur S. FLECK

Directeur : M. le Professeur H. PINON

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur G. CLERC

Directeur : M. le Professeur P. HANTZPERGUE

Directeur : M. le Professeur A. GOLDMAN

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : Mme. le Professeur H. PARROT

Directeur : M. C. COLLIGNON

Directeur : M. le Professeur R. BACON

Directeur : M. le Professeur J. LIETO

Directeur : M. le Professeur M. C. COULET

Directeur : M. le Professeur R. LAMARTINE

Directeur : M. le Professeur J.C. AUGROS

# Remerciements

---

Mes travaux de thèse, encadrés par Laurent BEZIN et Jean-Marc PEQUIGNOT, ont été réalisés au sein de l'UMR 5123 de Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire, dirigée par le Professeur Bruno ALLARD. J'ai bénéficié de la part de la Délégation Générale pour l'Armement d'une allocation de recherche de trois ans, qui a débuté le 1<sup>er</sup> octobre 2005. Je remercie mon correspondant à la Délégation Générale pour l'Armement, le Docteur Alain COURTIÈRE.

## **Je remercie...**

...les Professeurs Mohamed JABER et Jean MARIANI d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit de thèse et de faire partie de mon jury.

...le Professeur Philippe RYVLIN d'avoir apporté son fin regard d'épileptologue sur nos travaux de recherche. Je suis très honoré qu'il ait accepté de présider mon jury de thèse.

...le Docteur Jean-Jacques RISSO pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux de recherche. Je lui exprime également toute ma gratitude pour son implication dans l'obtention de mon financement de thèse. Je suis heureux qu'il ait accepté de participer à mon jury.

...le Professeur Jean-Marc PEQUIGNOT pour son enthousiasme à l'égard de ce projet de recherche. Il m'a toujours soutenu et encouragé avec une grande amabilité.

...le Docteur Laurent BEZIN pour son incommensurable implication dans l'encadrement de ce travail de recherche. J'ai eu la chance de bénéficier d'une excellente formation scientifique. Je lui suis particulièrement reconnaissant pour la confiance et le soutien qu'il m'a accordés à chacune des avancées dans ma jeune carrière scientifique.

... toutes les personnes de l'équipe RE2R qui ont largement participé à ce travail de recherche, et avec qui j'ai passé de très agréables moments: Amor BELMEGUENAI, Jacques BODENNEC, Chantal BONNET, Sandrine BOUVARD, Béatrice GEORGES, Marion LE CAVORSIN MOREAU, Anne MORALES, et Colette MOULIN. Merci à Frédérique COHEN-ADAD pour son implication dans mon projet professionnel, et bien sûr, pour les sublimes

photos qui illustrent ce manuscrit. Je remercie également Silvia ARANEDA, Andréi CIVIDJIAN, Yvette DALMAZ, Luc QUINTIN et Emil TOADER pour leur soutien.

...les (ex)doctorants de l'équipe avec qui j'ai partagé des moments inoubliables: Ahmed ATHAMENA, Aurélien BOUSSOUAR, Rafik DEY, Rafaat FARES, Hayet KOUCHI, Florent Lebon, Jérémie NADAM, Fabrice NAVARRO. Un immense merci à Kouchi et Raafat pour leur contribution scientifique et leur encouragement perpétuel.

...l'ensemble des membres de l'UMR, et plus particulièrement Marie-Thérèse BOILLON et Jean Sébastien GAILLARD pour leur précieuse aide administrative.

...toute l'équipe de Toulon encadrée par Jean-Jacques RISSO, qui m'a admirablement accueilli à chacune de mes missions « trauma » ; merci à Emilie CARRE, Myriam NICOLAS, Patrick LEDRUT, Nicolas Vallée et Boualem Zouani.

### **Je remercie affectueusement...**

...Katy, Christine, Laurent, Muriel, Hélène, Bibiana, Chantal, Charles, Yann, Chloé, Bertrand, Stef, Sabrina, Peush, Lydie, Thom, Clem, Sophie, Rodolphe, Christophe, Fabien, Olivier, Eva, Rémy et Pierre-Etienne, pour leur encouragement de chaque instant.

...mes parents, Viviane et Jean-Yves, pour la confiance qu'ils m'ont toujours accordée, et leur soutien durant ce long parcours universitaire.

*à Katy,*

# Communications

---

## Communications dans des journaux à comité de lecture

### Articles publiés:

- Nadam J, Navarro F, **Sanchez P**, Moulin C, Georges B, Laglaine A, Pequignot JM, Morales M, Ryvlin P, and Bezin L. (2007) *Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus*, *Neurobiology of Disease*, 25, p412–426.
- Navarro FP, Fares RP, **Sanchez PE**, Nadam J, Georges B, , Moulin C, Morales A, Pequignot JM, and Bezin L. (2008) *Brain heparanase is upregulated during postnatal development and hypoxia-induced neovascularization in adult rats*, *Journal of Neurochemistry*, 105, p34-45.

### Article accepté:

- **P.E. Sanchez**, F.P. Navarro, R.P. Fares, J. Nadam, B. Georges, C. Moulin, M. Le Cavorsin, C. Bonnet, P. Ryvlin, A. Belmeguenai, J. Bodennec, A. Morales, L. Bezin. *Erythropoietin receptor expression is concordant with erythropoietin but not with common  $\beta$  chain expression in the rat brain throughout lifespan*. *Journal of Comparative Neurology*. *Papier n°1*

### Article soumis:

- **P.E. Sanchez**, R.P. Fares, JJ. Risso, C. Bonnet, S. Bouvard, M. Le-Cavorsin, B. Georges, C. Moulin, A. Belmeguenai, J. Bodennec, A. Morales, JM. Pequignot, EE. Baulieu, L. Bezin. *Optimized erythropoietin neuroprotective effect follows induced expression of its receptor in neurons*. Soumis à PNAS. *Papier n°2*

### Articles en préparation:

- **P.E. Sanchez**, R.P. Fares, F.P. Navarro, C. Bonnet, C. Moulin, B. Georges, A. Belmeguenai, A. Morales, J. Bodennec, L. Bezin. *Molecular and cellular mechanisms of erythropoietin-mediated neuroprotection during epileptogenesis*. *Papier n°3*
- R.P. Fares, **P.E. Sanchez**, M. Le Cavorsin, B. Georges, C. Moulin, C. Bonnet, A. Belmeguenai, A. Morales, J. Bodennec, L. Bezin. *MARLAU™: A new cage to standardize cognitive stimulation in enriched environment for rodents*.

## Communications orales

### Posters

- Congrès international de l'Epilepsie (Paris, août 2005):  
J. Nadam, P. Ryvlin, **P. Sanchez**, C. Moulin, B. Georges, A. Morales, and L. Bezin. *Exogenous erythropoietin protects hilar interneurons against degenerative process after pilocarpine-induced Status Epilepticus in adult rat*.

- Congrès de la *Society for Neuroscience* (San Diego, novembre 2007):  
**PE Sanchez**, S Bouvard, B Georges, M Le Carvorsin, C Moulin, L Bezin. *Optimizing neuroprotective effect of erythropoietin requires elevating neuronal expression of its receptor EPO-R.*
- 12<sup>e</sup> journée scientifique de l'**Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé** (EDISS) (Lyon, mars 2008)  
**PE Sanchez**, S Bouvard, B Georges, M Le Carvorsin, C. Moulin, L Bezin. *Optimizing neuroprotective effect of erythropoietin requires elevating neuronal expression of its receptor EPO-R.*

### **Conférences**

- Symposium international de "Physiologie et Physiopathologie de la Haute Altitude". (Lyon, septembre 2005). *Improvement of hypoxia preconditioning protocol to increase the neuroprotective effects of erythropoietin.*
- Seconde Rencontres du CTRS "Cognitive Development in Epilepsy" (Lyon, Septembre 2008): *L'érythropoïétine: courir après sa cible.*
- First Franco-American military workshop on War Traumatism (Toulon, Octobre 2008). *Neuroprotection in Traumatic Brain Injury.*

# Sommaire

---

<b>Introduction</b>	<b>7</b>
<b>Etat de l'Art</b>	<b>10</b>
<b>Partie I : Le status epilepticus</b>	<b>11</b>
I.1 Définitions et données épidémiologiques	11
I.2 Dommages cérébraux et conséquences à long terme	11
I.3 Modèles expérimentaux du Status Epilepticus chez l'animal	12
I.3.a Introduction aux modèles de SE	12
I.3.b Induction du SE par voie pharmacologique	13
I.3.b Induction du SE par stimulation électrique	13
<b>Partie II: la neurodegenerescence</b>	<b>14</b>
II.1 Préambule	14
II.2 Bases moléculaires de la mort cellulaire	14
II.2.a Polémique autour de la mort cellulaire	14
II.2.b La Mort Cellulaire Active (MCA) provoquée par le <i>Status Epilepticus</i>	15
II.2.b.a La mort cellulaire active dépendante des caspases	17
II.2.b.a.a Les protéines effectrices de la mort cellulaire active: Les caspases	17
II.2.b.a.b Activation de la voie des caspases	17
II.2.b.a.c Molécules régulatrices de la mort cellulaire active	18
II.2.b.c La MCA indépendante des caspases	19
<b>Partie III. inflammation cérébrale : Implication dans la mort neuronale ?</b>	<b>20</b>
III.1 Définition	20
III.2 Inflammation cérébrale en réponse au Status Epilepticus	21
III.2.a. Réponse immunitaire innée	21
III.2.a.a Les médiateurs cellulaires	21
III.2.a.b Les médiateurs moléculaires	23
III.2-b Réponse inflammatoire cérébrale : renfort de la périphérie	24
III.3 Réponse inflammatoire après le Status Epilepticus : Effets neurotoxiques ou neuroprotecteurs ?	25
<b>Partie IV : Le système Epoergique cérébral et son implication dans la protection du système nerveux central</b>	<b>27</b>
IV.1 Préambule	27
IV.2 Le récepteur de l'érythropoïétine	27
IV.2.a Structure génique	27
IV.2.b Structure protéique	28
IV.2.c Mécanismes de régulation transcriptionnelle de l'EpoR cérébral	29
IV.2.d Maturation et migration de l'EpoR : rôle des modifications post-traductionnelles	29
IV.2.e Modèle d'activation de l'EpoR	30
IV.2.f Internalisation de l'EpoR	31
IV.2.g Expression cérébrale de l'EpoR dans les conditions basales	31
IV.2.h Variations de l'expression de l'EpoR dans le système nerveux central	33
IV.2.h.a Régulations physiologiques	33
IV.2.h.a.a Du développement foetal et postnatal jusqu'au vieillissement	33
IV.2.h.a.b Au cours de la différenciation neuronale	33
IV.2.h.a.c Contraintes environnementales	33
IV.2.h.a Régulations physiopathologiques	34
IV.2.h.b Régulations provoquées pharmacologiquement	35

IV.3 L'érythropoïétine _____	36
IV.3.a Structure génique _____	36
IV.3.b Structure protéique _____	36
IV.3.c Expression cérébrale de l'Epo dans les conditions basales _____	37
IV.3.d Variations de l'expression de l'Epo dans le système nerveux central _____	37
IV.3.d.a Régulations physiologique et physiopathologique du gène Epo _____	37
IV.3.d.a.a Au cours du développement fœtal et postnatal _____	37
IV.3.d.a.b En réponse aux contraintes environnementales _____	38
IV.3.d.a.c En réponse à des agressions cérébrales _____	38
IV.3.d.b Régulation transcriptionnelle de l'Epo : implication de HIF-1. _____	39
IV.3.d.b.a Présentation de HIF-1 _____	39
IV.3.d.b.b Concordance spatiale et temporelle de l'activation de HIF-1 et de l'expression du gène Epo _____	39
IV.4 Fonctions du système Epoergique cérébral _____	40
<b>Partie V : Espoirs thérapeutiques de l'Epo exogène _____</b>	<b>42</b>
V.1 Préambule _____	42
V.2 Les Epo de synthèse _____	42
V.3 Perméabilité des barrières du SNC à l'Epo exogène _____	43
V.4 Mise en évidence des effets neuroprotecteurs de l'EpoRH _____	45
V.4.a Etudes chez l'animal _____	45
V.4.b Etudes chez l'humain _____	48
<b>Partie VI : Comment le système Epoergique protège-t-il le SNC ? _____</b>	<b>49</b>
VI-1 Blocage des mécanismes de Mort Cellulaire Active dans les neurones _____	49
VI.2 Modulation de la neuroinflammation _____	52
VI.3 Modulation du flux sanguin cérébral _____	52
VI.4 Augmentation de la neurogenèse _____	53
<b>Partie VII : Les dérivés de l'EpoRH et les cibles alternatives potentielles _____</b>	<b>54</b>
VII.1 Dangers associés au traitement à l'EpoRH _____	54
VII.2 Les dérivés non hématopoïétiques de l'EpoRH et leurs effets neuroprotecteurs _____	55
VII.2.a Asialo-Epo _____	55
VII.2.b L'Epo carbamylée _____	55
VII.3 Identité du site de liaison de l'Epo dans le SNC : controverse ? _____	56
<b>Matériels &amp; Méthodes _____</b>	<b>58</b>
<b>Partie I : Expérimentations <i>in vivo</i> _____</b>	<b>59</b>
I.2 Animaux et conditions d'hébergements des animaux _____	59
I.2.a Phase d'acclimatation aux conditions d'hébergement _____	59
I.2.b Présentation de la cage Marlau™ de milieu enrichi _____	59
I.2 Protocoles d'exposition à l'hypoxie _____	61
I.3 Modèle d'induction du Status Epilepticus (SE) _____	61
I.3.a Induction du SE : traitements pharmacologiques _____	61
I.3.b Validation du modèle de SE par l'enregistrement électroencéphalographique _____	62
I.3.c Soins apportés aux animaux après le SE _____	63
I.4 Protocole d'administration de l'EpoRH _____	63
<b>Partie II : Expérimentations <i>ex vivo</i> _____</b>	<b>64</b>
II.1 Procédures pour la préparation du tissu cérébral _____	64
II.1.a Prélèvement et traitements des tissus frais _____	64
II.1.a.a Prélèvement des cerveaux et microdissections des structures cérébrales _____	64
II.1.a.b Traitements des échantillons tissulaires et préparation des ARN totaux _____	64
II.1.a.b.a Extraction des ARN totaux et purification _____	64
II.1.a.b.b Vérification de la qualité des ARN totaux _____	66

II.1.a.b.c Vérification de l'absence de contamination en ADN génomique	66
II.1.a Préparation des tissus fixés	68
II.2.a.a Fixation des tissus et prélèvement des cerveaux	68
II.2.a.b Coupe des cerveaux perfusés	68
II.3 Dosage des ARN messagers par transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne en temps réel	69
II.3.a La réaction de transcription inverse (RT)	69
II.3.a.a Calibration de la RT	69
II.3.a.b Calibration de la RT	69
II.3.b Amplification quantitative des ADNc d'intérêt par PCR en temps réel	70
II.3.b.a. Choix des amorces	70
II.3.b.b. Principe de la réaction de PCR en temps réel	70
II.3.b.c. Réalisation de la gamme étalon	71
II.3.b.d. Amplification des ADNc d'intérêt	72
II.4 Dosage des protéines	73
II.4.a Extraction des protéines totales sur homogénats tissulaires	73
II.4.b Dosage des protéines solubles totales par la méthode de BCA	74
II.4.c Dosage de l'EpoRH par la méthode ELISA	74
II.5 Etudes histologiques	74
II.5.a Coloration au crésyl violet et repérage anatomique	74
II.5.b Coloration au <i>FluoroJade B</i>	75
II.5.c Coloration TUNEL	75
II.5.d Détections immunohistochimiques	76
II.5.d.a Marquage colorimétrique	76
II.5.s.b (Double) détection immuno-fluorescente	77
II.5.e Détections <i>in situ</i> des cellules infiltrantes dans le cerveau	77
II.5.f Acquisition d'image et analyses histologiques	79
II.5.f.a Marquage fluorescent	79
II.5.f.a.a Acquisition par microscopie confocale	79
II.5.f.a.b Analyse d'image et quantification	79
II.5.f.b Marquage colorimétrique	79
II.5.f.b.a Acquisition par microscopie optique	79
II.5.f.b.b Analyse d'image et quantification	80
<b>Partie III : Expérimentations <i>in vitro</i></b>	<b>81</b>
III.1 Conditions de culture	81
III.2 Préparation et traitements des cellules PC12	81
<b>Résultats</b>	<b>82</b>
<b>Papier n° 1</b>	<b>83</b>
<b>Papier n° 2</b>	<b>106</b>
<b>Papier n° 3</b>	<b>126</b>
<b>Discussion générale</b>	<b>145</b>
<b>Partie I : Identité de l'EpoR dans le cerveau: vers l'invalidation de « la théorie de la Bc ».</b>	<b>146</b>
<b>Partie II : Expression cérébrale de l'EpoR au cours du développement et du vieillissement : Espoirs thérapeutiques &amp; craintes.</b>	<b>148</b>
II.1. L'EpoRH : pistes pour lutter contre la perte des capacités cognitives associée au vieillissement.	148
II.2. L'EpoRH chez les enfants prématurés: quelles conséquences neurobiologiques et cognitives ?	149
<b>Partie III : Augmenter l'expression neuronale de l'EpoR: Nouvelle stratégie pour améliorer les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH.</b>	<b>150</b>
III.1. Régulations géniques de l'EpoR	150

III.2. Le niveau d'expression neuronale de l'EpoR conditionne la réponse à l'EpoRH	152
<b>Partie IV : à la recherche des « enviromimetiques » activateur de l'expression des recepteurs cibles</b>	<b>153</b>
<b>Conclusions &amp; Perspectives</b>	<b>155</b>
<b>Conclusions illustrée</b>	<b>156</b>
<b>Perspectives</b>	<b>159</b>
I. Effets de l'EpoRH sur les monocytes/ macrophages infiltrant le parenchyme cérébral à la suite du SE.	159
II. Conséquences fonctionnelles de la neuroprotection par l'EpoRH associée au milieu enrichi.	160
<b>Abbréviations</b>	<b>162</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>165</b>

# Introduction

---

*"Neuroprotection may be defined as an attempt to maintain the highest possible integrity of cellular interactions in the brain, that is, protection of neural function. Neuroprotection represents the ultimate goal in the treatment of acute neurologic conditions and neurodegenerative disease."*

Hannelore Ehrenreich <sup>92</sup>

A la suite d'accidents neurologiques et au cours des maladies neurodégénératives, l'enjeu majeur est de préserver l'intégrité des réseaux neuronaux, afin de sauvegarder les fonctions cérébrales qu'ils contrôlent. Aujourd'hui, l'érythropoïétine (Epo) est la molécule la plus étudiée dans le domaine de la neuroprotection. Bien que son rôle physiologique a longtemps été restreint à la production d'érythrocytes, nos connaissances sur son champ d'action se sont largement étendues depuis sa découverte dans les cellules du système nerveux central (SNC). Les vertus protectrices connues de l'Epo endogène et de sa forme recombinante humaine (EpoRH) sur les cellules souches hématopoïétiques ont naturellement conduit les chercheurs à étudier les effets de l'administration d'EpoRH dans des modèles d'atteinte du SNC. Ainsi, les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH ont été démontrés dans une cinquantaine d'études chez l'animal, et dans cinq études chez l'humain <sup>22,92,155</sup>.

Toutefois, en modifiant les propriétés hémodynamiques du sang, l'EpoRH peut entraîner chez certains patients des effets secondaires indésirables, tels que des événements thrombotiques <sup>155</sup>. Des molécules dérivées de l'EpoRH, n'exerçant aucun effet hématopoïétique, mais conservant des propriétés neuroprotectrices, ont alors été développées. Le fait que ces molécules conservent une action neurobiologique, sans stimuler l'hématopoïèse, a fait naître l'idée selon laquelle le site de liaison de l'Epo dans le SNC serait différent de celui présent à la surface des cellules souches hématopoïétiques, c'est-à-dire un récepteur homodimérique [EpoR]<sub>2</sub>. Il a alors été proposé que le site de liaison de l'Epo dans le SNC soit en partie composé d'une chaîne β (βc), commune aux récepteurs d'autres cytokines. Cette proposition est née de l'observation que la réponse biologique des cellules BA/F3 à l'Epo s'améliore quand la sous-unité EpoR est associée à la βc <sup>115</sup>. En outre, dans un modèle de lésion de la moelle épinière, un dérivé de l'EpoRH perd ses effets neuroprotecteurs chez des souris transgéniques n'exprimant pas la βc <sup>23</sup>. Sur la base de ces deux études, M. Brines et A. Cerami ont proposé que les actions neurobiologiques et cytoprotectrices de l'Epo passent par un hétérorécepteur composé d'un homodimère βc et d'une sous-unité EpoR : EpoR/[βc]<sub>2</sub> <sup>22</sup>. Au regard de la littérature, il semble que cette théorie ait fait rapidement l'unanimité. **Pourtant, aucune preuve n'a été fournie, ni sur la présence de la βc dans le SNC, ni sur les variations coordonnées de l'expression cérébrale de l'EpoR et de la βc. Or, ces deux informations apparaissent primordiales pour valider la possibilité d'une interaction entre la βc et l'EpoR dans la composition**

**du site de liaison de l'Epo au niveau du SNC. Le premier objectif de la thèse était donc de vérifier ces deux informations.**

Les effets du traitement à l'EpoRH ont été testés dans de nombreux modèles d'atteintes du SNC chez l'animal. Cependant, notre équipe est la première à avoir étudié les effets de cette molécule dans un modèle de *Status Epilepticus (SE)*. Nous avons démontré qu'un traitement à l'EpoRH protège la quasi-totalité des neurones de l'hippocampe à la suite d'un *SE* chez le rat <sup>176</sup>. En revanche, l'EpoRH n'a pas d'effets protecteurs dans les régions cérébrales les plus dévastées par le *SE*, telles que le thalamus dorsal, le cortex piriforme et les noyaux amygdaliens (données non publiées). Ces dernières observations nous ont conduits à nous interroger sur les raisons des effets hétérogènes de l'EpoRH dans le cerveau. Sachant que les niveaux d'expression de l'EpoR sont différents dans le SNC <sup>176</sup>, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les niveaux d'expression de l'EpoR seraient trop faibles dans certaines structures cérébrales pour que l'EpoRH puisse exercer ses effets neuroprotecteurs. Or, étant donné que le niveau d'expression tissulaire de l'EpoR conditionne sa capacité de réponse à l'Epo <sup>33</sup>, et que l'expression cérébrale de l'EpoR augmente en réponse à un environnement extrême de longue durée chez le rat <sup>220</sup> (ambiance chaude), **nous avons i) rechercher des stimuli environnementaux capables d'augmenter l'expression cérébrale de l'EpoR chez le rat adulte, et ii) vérifier si cette augmentation de l'expression de l'EpoR améliore les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH dans le modèle de SE, dans les régions cérébrales les plus vulnérables.**

Les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels l'Epo exerce ses effets neuroprotecteurs sont encore largement méconnus. Alors que des études montrent que l'EpoRH activent des voies de signalisation intracellulaire de « survie » dans les neurones, d'autres études suggèrent que l'EpoRH pourrait protéger les neurones en exerçant des effets anti-inflammatoires. Notre modèle de *SE* chez le rat adulte déclenche une réponse inflammatoire de grande ampleur. Cette réponse se traduit par une induction rapide des cytokines pro-inflammatoires, une activation des cellules immunitaires du cerveau, et une infiltration massive de cellules immunitaires périphériques dans le parenchyme cérébral <sup>180,198</sup>. Ce modèle représente donc une formidable opportunité pour **rechercher les mécanismes par lesquels l'EpoRH sauve les neurones; en étudiant i) les voies de signalisation intracellulaire de « survie » connues pour être déclenchées par l'EpoRH, et ii) les éventuelles modifications de la réponse inflammatoire précoce et différée.**

## Etat de l'Art

---



*Epilepsie*, de Frédérique Cohen-Adad.

## PARTIE I : LE STATUS EPILEPTICUS

### I.1 Définitions et données épidémiologiques

Le *Status Epilepticus (SE)*, ou état de mal épileptique, représente une des urgences neurologiques médicales la plus fréquente, notamment chez les enfants et les personnes âgées. Le *SE* se manifeste chez le patient soit par une crise prolongée supérieure à 10 minutes, soit par une répétition de crises sans reprise de conscience. Les accidents neurologiques, l'abus d'alcool, les infections du système nerveux central (SNC), les perturbations métaboliques et les intoxications sont autant d'étiologies caractérisées du *SE*<sup>73</sup>. Il existe plusieurs formes de *SE* dont les deux principales sont le *SE* convulsif et le *SE* non convulsif. Dans le premier cas, le sujet est victime de crises tonico-cloniques généralisées souvent spectaculaires, alors que dans le second cas, le patient est atteint de troubles confusionnels. L'électroencéphalogramme permet d'établir le diagnostic du *SE* et de prescrire la médication adaptée en urgence. Le premier objectif thérapeutique est l'arrêt immédiat des crises cérébrales. En effet, plus le *SE* se prolonge, plus les risques de mortalité et de co-morbidité augmentent<sup>249</sup>. Cet état d'urgence requiert donc l'usage de molécules qui réduisent l'hyperexcitation cérébrale, telles que les benzodiazépines, les barbituriques, certaines « drogues anti-épileptiques » et, en dernier recours, les anesthésiques<sup>151,181</sup>.

#### Le Status Epilepticus en quelques chiffres...

##### Incidence

- ~30 000 personnes/ an en France
- ~160 000 personnes/ an aux Etats-Unis

##### Mortalité à la suite du SE

- ~22 % sur l'ensemble des *SE* répertoriés
- ~3 % chez les enfants
- ~38 % chez les personnes de plus de 60 ans
- ~32 % lorsque le *SE* dure plus d'une heure
- ~3 % lorsque le *SE* dure moins d'une heure

##### Conséquences à long terme

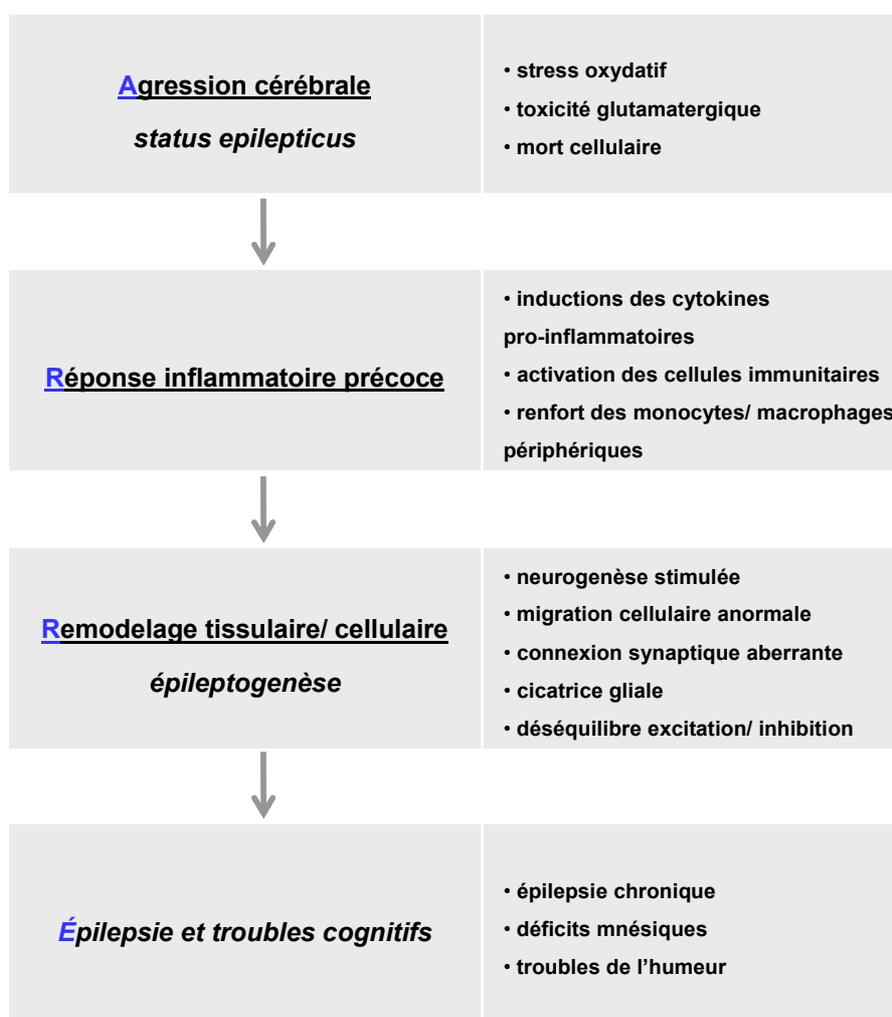
- 41% des victimes développent une épilepsie mésiale du lobe temporal
- ~10 % des victimes infantiles présentent des séquelles cognitives.

Références bibliographiques<sup>52,73,102,149,151,248,249</sup>

### I.2 Dommages cérébraux et conséquences à long terme

Chez l'humain, le *SE* est associé à d'importants dommages cérébraux dans plusieurs régions du cerveau. En effet, les études histologiques sur des cerveaux de patients décédés à la suite d'un *SE* montrent des lésions neuronales dans l'hippocampe et l'amygdale<sup>51,75,231</sup>. En outre, la concentration d'énolase dans le liquide céphalo-rachidien, indicateur d'une souffrance neuronale, augmente chez les patients victimes de *SE*<sup>50</sup>. Les techniques d'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) ont permis d'évaluer la progression des lésions cérébrales à la suite d'un *SE*. Dans la phase précoce, des oedèmes sont généralement observés dans l'hippocampe, avec évolution possible dans la phase tardive (quelques mois après le *SE*) vers une sclérose de l'hippocampe<sup>214,280</sup>. La sclérose est caractérisée par une atrophie de la structure cérébrale et par une cicatrice gliale. Dans le cadre du *SE*, les lésions cérébrales et les remaniements morphologiques

sont considérés comme responsables du développement de l'épilepsie mésiale du lobe temporal et des séquelles cognitives associées <sup>2,73</sup> (voir figure 1). Ainsi, afin de réduire les conséquences neurologiques à long terme associées au *SE*, il conviendrait de réduire les dommages cérébraux en i) diminuant la durée du *SE* et ii) administrant une/des molécule(s) neuroprotectrice(s). Actuellement, les cliniciens disposent de moyens thérapeutiques pour arrêter le *SE* (hormis dans le cadre des *SE* réfractaires), mais pas pour préserver l'intégrité anatomique et fonctionnelle des neurones.



**Figure 1: Conséquences neurobiologiques et fonctionnelles du Status Epilepticus.** Après l'agression cérébrale initiale, les événements cellulaires et moléculaires générés dans le cerveau contribuent à l'installation du syndrome épileptique, associé à des séquelles cognitives. (D'après Acharya MM 2008)

### ***1.3 Modèles expérimentaux du Status Epilepticus chez l'animal***

#### **I.3.a Introduction aux modèles de SE**

Depuis une trentaine d'années, les chercheurs disposent de plusieurs modèles expérimentaux de *SE* chez l'animal qui leur permettent non seulement de rechercher les

mécanismes impliqués dans les dommages cérébraux induits par le *SE*, mais aussi de tester des molécules potentiellement neuroprotectrices. Chez l'animal, le *SE* est généralement induit soit par des agents pharmacologiques, soit par des stimulations électriques. Selon la méthode d'induction du *SE*, les manifestations comportementales pendant la crise, les dommages cérébraux et les conséquences à long terme présentent plus ou moins de similitudes avec la pathologie humaine. En outre, la majorité de ces modèles est utilisée pour mimer le développement d'un syndrome épileptique puisque quelques jours après le *SE*, l'animal développe des crises récurrentes et spontanées<sup>138</sup>. La période de latence entre le *SE* et l'apparition des crises épileptiques est appelée période d'épileptogenèse.

### **I.3.b Induction du *SE* par voie pharmacologique**

Les deux principaux agents pharmacologiques utilisés pour déclencher le *SE* sont l'acide kaïnique et la pilocarpine. L'acide kaïnique est un agoniste du glutamate, spécifique des récepteurs ionotropiques de type kaïnate, tandis que la pilocarpine est un agoniste de l'acétylcholine, spécifique des récepteurs muscariniques. Les modèles de *SE* induits par l'acide kaïnique et la pilocarpine ont été respectivement développés par les équipes de Y. Ben-Ari<sup>15</sup> et de L. Turski<sup>253</sup>. Le *SE* est déclenché quelques minutes après l'administration systémique ou cérébrale de l'un des deux agents et, généralement, arrêté par une molécule appartenant à la famille des benzodiazépines. Dans ces deux modèles les lésions neuronales sont observées dans des aires cérébrales identiques, mais diffèrent par leur ampleur et leur temps d'apparition<sup>46</sup>. L'hippocampe, les noyaux amygdaliens, le thalamus dorsal, le cortex piriforme et certaines régions du néocortex sont particulièrement affectés dans les 24 heures qui suivent le *SE* induit pharmacologiquement<sup>46,75,176</sup>. Les premières crises récurrentes spontanées surviennent dans les deux premières semaines après le *SE*.

### **I.3.b Induction du *SE* par stimulation électrique**

Chez l'animal, le *SE* est aussi provoqué par des stimulations électriques de la voie perforante<sup>229</sup>, de l'hippocampe ventral<sup>150</sup>, du noyau baso-latéral de l'amygdale<sup>167</sup> et du cortex piriforme<sup>107</sup>. Les protocoles de stimulation varient selon la structure stimulée et les lésions visées. Le principal avantage de ce modèle réside donc dans le fait que l'expérimentateur contrôle la durée et l'intensité du *SE* ; il peut ainsi éviter de provoquer des lésions neuronales trop importantes, qui ne reflètent pas la pathologie humaine<sup>170,231</sup>. Ainsi, dans le modèle de stimulation de la voie perforante par exemple, les lésions initiales affectent presque exclusivement l'hippocampe ipsilatéral à la suite de la stimulation<sup>231</sup>.

## **PARTIE II: LA NEURODEGENERESCENCE**

### **II.1 Préambule**

La mort cellulaire est un processus physiologique indispensable au bon fonctionnement du cerveau et à sa protection contre d'éventuelles infections ou tumeurs. Les neurones défectueux, en excès, inutiles, obsolètes ou nuisibles sont ainsi éliminés. En revanche, dans le cadre des maladies neurodégénératives (par exemple, les maladies d'Alzheimer, d'Huntington ou de Parkinson) et des accidents cérébraux (par exemple, le traumatisme crânien, l'accident vasculaire cérébral et le *Status Epilepticus*), la mort massive des neurones est tenue pour responsable des séquelles cognitives et fonctionnelles à moyen et long termes. L'un des enjeux majeur de la recherche est donc de trouver des stratégies pour protéger les neurones dans le cadre de ces atteintes neurologiques. Mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à la mort neuronale est une des voies privilégiées pour découvrir des molécules susceptibles d'enrayer les processus de mort cellulaire.

### **II.2 Bases moléculaires de la mort cellulaire**

#### **II.2.a Polémique autour de la mort cellulaire**

*"Rendez les choses aussi simples que possible, mais pas plus simples."*

Albert Einstein

Nécrose, mort programmée, apoptose, autophagie, oncose, paraptose, nécrose programmée, etc. Bienvenue dans le jargon de la mort cellulaire ! Depuis plusieurs années, les nombreuses théories et définitions sur les processus de la mort cellulaire font l'objet de débats très animés dans la communauté scientifique, sans toutefois conduire à des consensus<sup>21,70,76,130,205,294</sup>. L'analyse de Robert Sloviter a toutefois permis de faire avancer le débat autour de ces notions complexes de mort cellulaire<sup>230</sup>. Au regard des désaccords sur les terminologies et les définitions des processus de mort (voir l'encadré 1), l'auteur, inspiré par la « doctrine de la simplicité » du philosophe Guillaume d'Occam, propose un retour à des concepts plus simples et certainement plus constructifs. Ainsi, il conviendrait de considérer qu'il existe deux principales formes de mort cellulaire, la mort cellulaire « passive » (MCP) et la mort cellulaire « active » (MCA). La MCP est une mort accidentelle immédiate, n'offrant donc aucun espoir thérapeutique. Les lésions tissulaires induites mécaniquement après un traumatisme crânien, les expositions à des températures extrêmes ou à des agents toxiques, sont autant de causes qui provoquent des pertes neuronales par MCP. En revanche, la MCA est une mort qui requiert

l'activation de processus intracellulaires complexes relativement lents, et offre donc une fenêtre thérapeutique pour contrecarrer ces mécanismes à l'aide d'agents neuroprotecteurs.

### Encadré 1. Confusions dans la terminologie de la mort cellulaire

A l'origine, le terme *apoptose* désignait une mort cellulaire sur la base de caractéristiques morphologiques<sup>123</sup> ; comprenant entre autres, une condensation et une fragmentation nucléaire, une formation de petites vésicules appelées « corps apoptotiques », et un maintien de l'intégrité de la membrane plasmique<sup>200</sup>. Depuis une dizaine d'années, la découverte de l'implication de molécules dans l'avènement de la mort cellulaire a conduit la communauté scientifique à assimiler, à tort, le terme apoptose à des événements biochimiques intracellulaires, sans vérifier la présence des modifications morphologiques qui le caractérisent<sup>75,230</sup>. L'illustration la plus marquante de cette dérive collective réside certainement dans le fait de désigner systématiquement une cellule comme étant apoptotique dès qu'elle présente i) une fragmentation nucléaire de l'ADN ou ii) une activation de la voie des caspases. Pourtant, plusieurs études ont montré que ces deux dernières caractéristiques sont également retrouvées dans une autre forme de mort cellulaire, la *nécrose*<sup>76,77,103,108</sup>. La nécrose se caractérise par la perte de l'intégrité de la membrane plasmique, entraînant le gonflement puis l'éclatement de la cellule.

La nécrose se distingue donc de l'apoptose par ses caractéristiques morphologiques, mais pas forcément par les mécanismes intracellulaires responsables de la mort cellulaire. Ainsi, afin de désigner une cellule comme étant apoptotique, il conviendrait d'utiliser des techniques d'imagerie appropriées de manière à observer les caractéristiques morphologiques de cette mort, et non d'utiliser des marqueurs biochimiques non spécifiques de l'apoptose. Cet exemple de confusion dans le domaine de la mort cellulaire est loin d'être isolé puisque au regard des dernières revues sur le sujet<sup>21,99,130,240</sup>, il paraît difficile de trouver un consensus dans la terminologie de la mort cellulaire, ce qui conduit à l'invention de nouveaux termes tels que « mort cellulaire programmée ressemblant à l'apoptose », « mort cellulaire programmée ressemblant à la nécrose », « apoptose classique », « apoptose dépendante des caspases », etc.

Afin de se libérer des carcans imposés par ces définitions, et des imbroglios qu'elles suscitent, Robert Sloviter propose de simplifier la terminologie de la mort cellulaire, en proposant les termes de Mort Cellulaire Active (différée) et de Mort Cellulaire Passive (immédiate), tout simplement<sup>230</sup>.

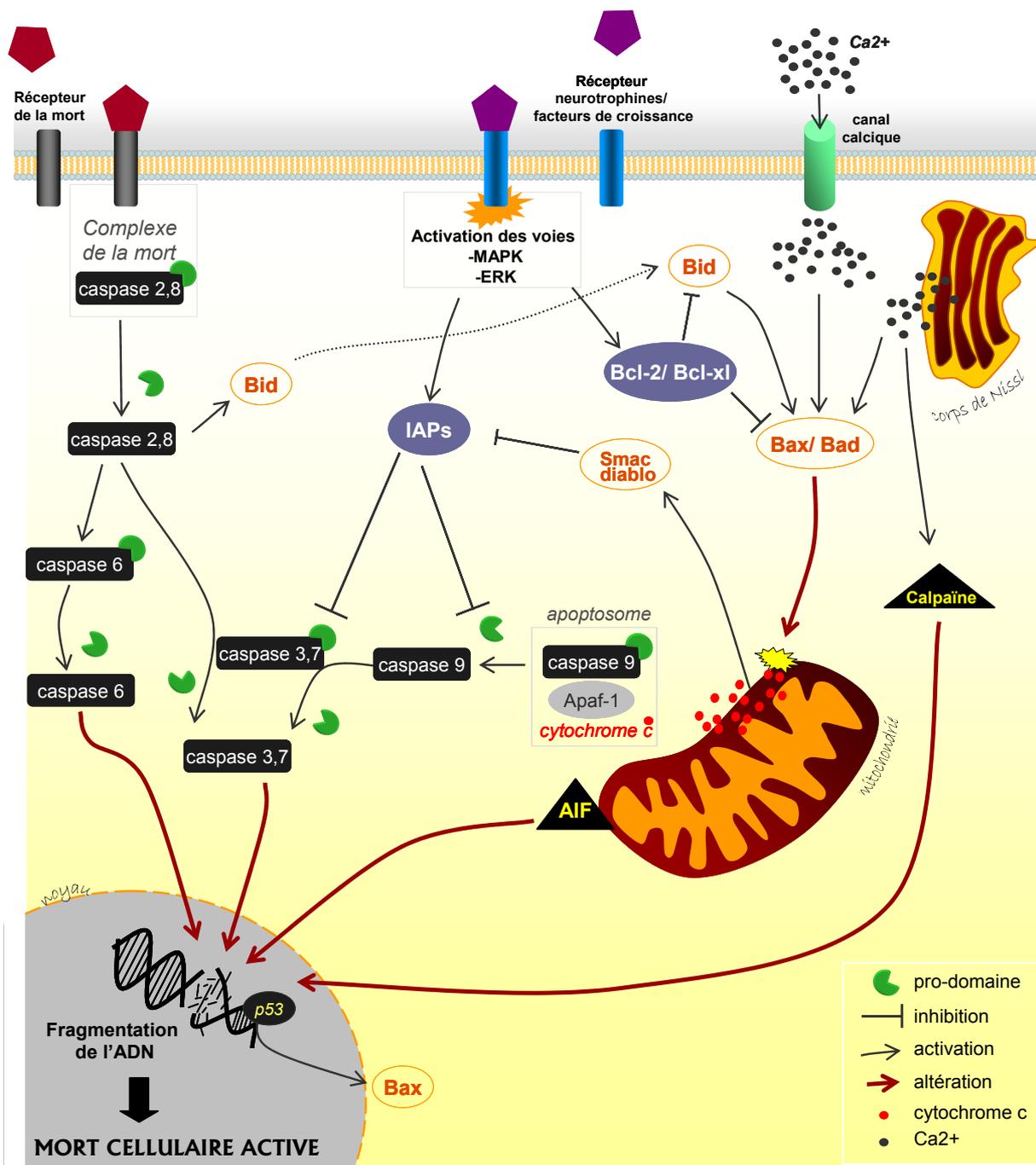
## II.2.b La Mort Cellulaire Active (MCA) provoquée par le *Status Epilepticus*

*"Chaque cellule [...] produit les protéines capables de la tuer. Ne survivent que celles qui sont aptes, pour un temps, à s'opposer à la mise en oeuvre du programme de mort."*

Nicole Le Douarin<sup>136</sup>

Le neurone est exposé en permanence à des signaux de vie et de mort provenant des milieux intra- et extra-cellulaires. Lors d'un *SE*, l'activation excessive des signaux de mort déséquilibre l'homéostasie cellulaire, et entraîne la mort de nombreux neurones. Les paragraphes suivants présentent i) les principaux médiateurs moléculaires de la MCA, ii) l'activité des molécules endogènes inhibitrices des processus de la MCA, et iii) les

études chez l'animal qui ont démontré l'implication de ces différents mécanismes dans la MCA à la suite d'un SE. La synthèse de ces mécanismes est illustrée à la figure 2.



**Figure 2: Mécanismes de signalisation intracellulaires identifiés de la MCA après SE.**

**La MCA indépendante des caspases** est déclenchée par la calpaïne et le facteur AIF. **La MCA dépendante des caspases** est déclenchée soit par l'activation d'un « récepteur de la mort », soit par la libération du cytochrome c par la mitochondrie. Une fois activé, le « récepteur de la mort » forme un complexe protéique avec les pro-caspases 2 et 8. Les caspases initiatrices 2 et 8 provoquent alors l'activation des caspases effectrices 6, 3 et 7 et de la protéine Bid qui, par l'activation de Bax et Bad, provoquent l'altération de la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome c. L'association du cytochrome c avec l'Apaf-1 (facteur d'activation de l'apoptose 1) et la pro-caspase 9 initiatrice constitue un complexe protéique appelé apoptosome qui permet le clivage de la pro-caspase 9 en caspase 9 activée. La caspase 9 catalyse les pro-caspases 3 et 7, qui activent à leur tour des protéines nucléaires responsables de la fragmentation de l'ADN. La libération du cytochrome c par la mitochondrie est donc contrôlée par les activités de Bax et Bad qui sont elles-mêmes dépendantes de i) la concentration de calcium intracellulaire (contrôlée par l'influx calcique par les canaux ioniques et la libération de calcium par les corps de Nissl), ii) de Bid et iii) de p53, activé lorsque l'ADN est fragmenté. Ces signaux de mort sont inhibés par les protéines Bcl-2 et Bcl-xL qui réduisent l'activité de Bax et Bad, mais aussi par les IAP qui inactivent les caspases. Les protéines qui freinent les processus de mort sont déclenchées par l'activation des récepteurs aux neurotrophines/ facteurs de croissance. Les IAP sont inhibées par la protéine Smac/ Diablo qui est libérée par la mitochondrie.

## ***II.2.b.a La mort cellulaire active dépendante des caspases***

### ***II.2.b.a.a Les protéines effectrices de la mort cellulaire active: Les caspases***

La MCA dépendante des caspases implique l'activation de protéases à cystéine appelées caspases, existantes sous 13 formes différentes chez les mammifères <sup>193</sup>. Ces enzymes, synthétisées de manière constitutive dans les cellules, sont présentes sous leur forme zymogène (inactive), les pro-caspases. Leur activité est non seulement régulée par leur propre activation mais aussi par des protéines inhibitrices endogènes. Le clivage d'une pro-caspase au niveau de son site catalytique entraîne l'activation de la caspase. Les caspases sont classées en deux catégories, celles qui possèdent un pro-domaine long sont initiatrices de la MCA (par exemple, caspases 8 et 9) alors que celles qui possèdent un pro-domaine court sont effectrices de la MCA (par exemple, caspases 3 et 7).

**Quelques heures après un SE**, les neurones présents dans les régions les plus affectées par le stress excitotoxique présentent une augmentation de l'expression de la forme active des caspases initiatrices 2 <sup>100</sup>, 8 <sup>97,140</sup> et 9 <sup>96,140</sup>, ainsi que des caspases effectrices 3 <sup>8,139,275</sup> et 6 <sup>101,179</sup>. La forme clivée de la caspase 7 n'est pas induite à la suite du SE mais sa forme zymogène est sensiblement augmentée <sup>101</sup>. L'induction de la forme active de certaines caspases a lieu dans les neurones qui présentent une fragmentation de l'ADN, suggérant un rôle de l'activation de ces protéases dans la MCA <sup>99</sup>.

### ***II.2.b.a.b Activation de la voie des caspases***

L'activation de la voie des caspases peut être déclenchée par la voie extrinsèque, via les « récepteurs de la mort », et par la voie intrinsèque, via la libération mitochondriale du cytochrome c. Les neurones présentent à leur surface plusieurs types de « récepteurs de la mort » qui, une fois activés, déclenchent la cascade des caspases <sup>21</sup>. En outre, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire qui dépend, non seulement de l'entrée de calcium dans la cellule, mais aussi de la libération de calcium par les corps de Nissl, est une des causes de l'altération de l'intégrité de la membrane mitochondriale <sup>99</sup>. Or, lorsque cette membrane devient anormalement perméable, le cytochrome c localisé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie est libéré vers le cytosol et forme un complexe protéique qui active la caspase 9 et, en conséquence, la cascade des caspases effectrices de la MCA.

**A la suite du SE**, les expressions de Fas et Fadd, principaux constituants d'un des « récepteurs de la mort », sont augmentées dans les régions où la perte neuronale est la plus importante <sup>97</sup>, suggérant l'implication de la voie extrinsèque dans la MCA induite par le SE. De plus, la concentration calcique augmente sensiblement dans les neurones de

l'hippocampe à la suite d'un *SE*<sup>199</sup>. Pendant le *SE*, la sur-activation des récepteurs ionotropiques au glutamate est la principale cause de l'entrée massive de calcium dans la cellule. Cette accumulation intracellulaire du calcium est responsable de l'augmentation de la concentration de cytochrome c dans le cytosol<sup>96,140</sup>.

### ***II.2.b.a.c Molécules régulatrices de la mort cellulaire active***

#### **La famille Bcl-2**

La famille Bcl-2 comprend des protéines qui favorisent la MCA dépendante des caspases et d'autres qui l'inhibent. L'entrée massive de calcium dans la cellule ou la libération du calcium par les corps de Nissl active Bax et Bad, deux membres de la famille Bcl-2 qui sont responsables du largage mitochondrial du cytochrome c<sup>98,99</sup>. De plus, la caspase 8 (activée via le récepteur de la mort) serait impliquée dans l'activation de Bax par l'intermédiaire de la protéine Bid. L'activité de ces protéines qui induisent la libération du cytochrome c est régulée par d'autres membres de la famille Bcl-2 tels que Bcl-2 et Bcl-xl. L'expression et l'activité de Bcl-2 e Bcl-xl sont contrôlées par l'activation des récepteurs transmembranaires aux facteurs de croissance et aux neurotrophines<sup>294</sup>. Ainsi, Bcl-2 et Bcl-xl protègent les neurones par la neutralisation des protéines Bax, Bad et Bid, maintenant ainsi l'intégrité de la membrane mitochondriale<sup>45,99</sup>.

**A la suite du *SE***, la concentration intracellulaire des protéines activées Bax, Bad et Bid est augmentée<sup>95,97,128,140,254,272</sup>. Bax s'accumule au niveau de la membrane interne des mitochondries après le *SE*<sup>95</sup>. L'administration d'un agent inhibiteur de la caspase 8, avant et après le *SE*, réduit l'activation de Bid, la libération du cytochrome c, et le clivage de la caspase 9. Dans cette étude, la protection des neurones de l'hippocampe par l'inhibiteur de la caspase 8 montre bien que cette protéase est particulièrement impliquée à la suite du *SE* dans l'activation des voies de signalisation de la MCA dépendante du cytochrome c<sup>140</sup>. Ainsi, l'activation de la caspase initiateur 8 participerait indirectement à celle de la caspase initiateur 9. Ces données suggèrent donc l'implication de l'activité des protéines Bax, Bad et Bid dans l'altération de la membrane de la mitochondrie en réponse au *SE*.

#### **La protéine suppresseur de tumeur p53**

La protéine p53 est un facteur de transcription principalement activé par les lésions de l'ADN et les perturbations métaboliques de la cellule. A l'état basal, p53 est dégradée en permanence par le protéasome. En condition de souffrance cellulaire, l'inhibition des processus de dégradation de p53 entraîne l'accumulation de p53 dans la cellule. Ainsi, outre son intervention sur la modification du cycle cellulaire, p53 déclenche indirectement la voie des caspases. En effet, lorsque les perturbations cellulaires sont sévères, p53

active l'expression du gène *Bax*, responsable de l'altération de l'intégrité de la membrane mitochondriale, entraînant la libération du cytochrome c dans le cytosol, et par conséquent, l'activation de la caspase 9<sup>47</sup>.

**Quelques heures après un SE**, de fortes accumulations du transcrit et de la protéine p53 sont observées dans les neurones souffrants de l'hippocampe<sup>245,246</sup>. En outre, l'activité de liaison à l'ADN de p53 est augmentée dans l'hippocampe<sup>148</sup>, traduisant une augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53. L'ensemble de ces données suggère que p53 est impliqué dans la MCA.

### Les protéines inhibitrices de la Mort Cellulaire Active

Les protéines inhibitrices de la MCA dépendante des caspases (communément appelées, à tort, protéines inhibitrices de l'apoptose ou IAP), existantes sous 8 formes différentes chez les mammifères, inhibent l'activité des caspases. Les IAP représentent donc un frein endogène à la MCA et exercent leurs propriétés inhibitrices en se fixant sur les caspases 3, 7 et 9. En outre, l'activité des IAP est inhibée par la protéine Smac/ Diablo, membre de la famille Bcl-2<sup>193</sup>.

**A la suite d'un SE**, une augmentation de l'expression de la protéine X-IAP est observée dans les neurones de l'hippocampe qui résistent à l'agression excitotoxique. De plus, alors que l'expression constitutive de X-IAP est importante dans les neurones de CA3, X-IAP n'est pas détectée dans les neurones en cours de dégénérescence<sup>127</sup>. Les effets neuroprotecteurs de l'administration systémique de X-IAP après le SE s'accompagnent d'une réduction de la quantité des caspases 3 et 9 activées, ce qui montre que X-IAP prévient la MCA en bloquant la cascade des caspases<sup>139</sup>. La régulation de l'activité des IAP par la protéine Smac/ Diablo n'a jamais été démontrée après le SE, néanmoins, la protéine Smac/ Diablo est augmentée dans les heures qui suivent l'arrêt du SE<sup>140</sup>.

### II.2.b.c La MCA indépendante des caspases

Certaines formes de MCA ne requièrent pas l'activation des caspases. En effet, il existe des voies de signalisation intracellulaires qui conduisent à la mort de la cellule sans impliquer la cascade des caspases<sup>130</sup>. Des études *in vitro* montrent que les neurones meurent malgré l'inhibition de la voie des caspases<sup>240</sup>. La MCA indépendante des caspases pourrait ainsi être déclenchée par la calpaïne, protéase dépendante du calcium, ou la protéine AIF. Ainsi, l'inhibition de la voie des caspases par des molécules endogènes serait compensée par d'autres processus de mort. Nos connaissances sur l'identité et les mécanismes d'action des médiateurs impliqués dans les MCA indépendantes des caspases sont encore très restreintes. Toutefois, ces avancées démontrent que la voie des caspases n'est pas l'unique voie de signalisation qui aboutit à

la mort cellulaire, et ouvre ainsi le champ d'investigation vers d'autres « processus de mort » qui pourraient devenir des cibles potentielles de neuroprotection.

**A la suite d'un SE**, l'expression et l'activité de la calpaïne sont augmentées dans les régions cérébrales lésées <sup>8,272</sup>. De plus, la réduction de l'activité de la calpaïne par l'administration systémique de son inhibiteur (MDL 28170) diminue la mort cellulaire induite par le SE <sup>8</sup>. La protéine AIF semble aussi être impliquée dans la MCA indépendante des caspases après un SE. En effet, les souris transgéniques Harlequin qui n'expriment pas AIF, présentent à la suite d'un SE une neurodégénérescence beaucoup plus faible que les souris sauvages <sup>35</sup>. Ces études indiquent donc que la calpaïne et AIF sont impliqués dans la MCA après le SE.

### ***A retenir !***

Le SE chez l'homme comme chez l'animal est une agression neurologique sévère qui provoque la mort massive des neurones, notamment dans les régions limbiques. Aujourd'hui, aucun traitement n'existe pour protéger les neurones lors d'un SE. La mort cellulaire met en jeu des processus biologiques très complexes qui restent encore largement méconnus. Néanmoins, dans le cadre du SE chez l'animal, plusieurs études ont permis d'identifier certaines molécules impliquées dans la Mort Cellulaire Active des neurones, qui pourraient être les cibles de certains agents pharmacologiques. Par exemple, le blocage de la voie des caspases et l'activité de Bax, de Bad et du "récepteur de la mort" seraient autant de solutions pour enrayer les processus de mort. Au contraire, l'activation de certains récepteurs aux neurotrophines représenterait, par l'induction/ l'activation des protéines Bcl-2, Bcl-XL et IAPs, une autre stratégie de neuroprotection.

## **PARTIE III. INFLAMMATION CEREBRALE : IMPLICATION DANS LA MORT NEURONALE ?**

### ***III.1 Définition***

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme en réponse à des stimuli nocifs. La réponse inflammatoire est assurée par les cellules immunitaires compétentes (leucocytes) qui infiltreront les tissus en danger. Toutefois, dans le SNC, le système immunitaire possède ses propres caractéristiques. En effet, la barrière hémato-encéphalique (BHE) isole le SNC de la périphérie, et réduit ainsi les possibilités d'infiltration des cellules immunitaires périphériques dans le parenchyme cérébral <sup>78</sup>. Pour assurer sa défense, le SNC est doté d'un système immunitaire inné original, composé de plusieurs cellules résidentes : les cellules microgliales, les astrocytes, les cellules périvasculaires et les péricytes. Dès qu'un danger est ressenti, l'état de ces

cellules est modifié afin de déclencher une réponse inflammatoire : on parlera alors d'état activé. En outre, dans certaines conditions pathologiques, la réponse innée est susceptible de déclencher une réponse immunitaire adaptative de renfort faisant intervenir des cellules immunitaires de la périphérie telles que les lymphocytes. Il convient de distinguer l'inflammation aiguë, qui est déclenchée à la suite d'une agression cérébrale (par exemple, l'ischémie cérébrale, le *SE*), de l'inflammation chronique, qui est mise en place dans certaines pathologies du SNC (par exemple, la maladie d'Alzheimer).

### ***III.2 Inflammation cérébrale en réponse au Status Epilepticus***

#### **III.2.a. Réponse immunitaire innée**

##### ***III.2.a.a Les médiateurs cellulaires***

Dans le SNC, les cellules de l'immunité innée regroupent les cellules microgliales, les astrocytes, les péricytes et les cellules périvasculaires (voir tableau 1 et figure 3). Dans le cerveau sain, l'ensemble de ces cellules participe au maintien de l'intégrité des neurones<sup>185,213</sup>. Lors d'une agression cérébrale, ces cellules s'activent afin de déclencher une réponse inflammatoire. Les cellules microgliales changent progressivement de morphologie, passant d'une forme ramifiée à une forme amiboïde<sup>241</sup>, tandis que les corps cellulaires des astrocytes s'épaississent<sup>71</sup>. Une fois activés, ces deux types cellulaires libèrent des neurotrophines et des molécules pro-inflammatoires. Les péricytes, constituants de la BHE<sup>1</sup>, représentent la première ligne de défense du SNC. Les péricytes seraient capables de se différencier en cellules microgliales activées dans le parenchyme cérébral<sup>247</sup>, tandis que les cellules périvasculaires, présentant une forte capacité d'une part à incorporer des éléments étrangers de l'espace périvasculaire, et d'autre part à migrer dans le liquide céphalo-rachidien<sup>13,281</sup>, pourraient alerter le système immunitaire périphérique en présentant des antigènes capturés. L'activation, la prolifération, et l'accumulation des astrocytes et des cellules microgliales dans les régions lésées conduit à l'installation d'une gliose réactionnelle respectivement appelée astrogliose et microgliose.

**A la suite d'un *SE***, l'activation des péricytes et des cellules périvasculaires n'a jamais été étudiée. En revanche, plusieurs études rapportent une activation des cellules microgliales et des astrocytes après un *SE* chez l'animal (voir figure 3). En effet, les modifications morphologiques de ces deux types de cellules gliales surviennent quelques heures après le *SE* dans les régions cérébrales lésées, perdurent pendant au moins une semaine, et aboutissent à la formation d'une gliose<sup>198,203,218</sup>. Dans les régions limbiques ventrales, où la neurodégénérescence est la plus importante, une perte massive d'astrocytes est observée<sup>267</sup>, suggérant que toute présence de cicatrice gliale serait forcément d'origine microgliale.

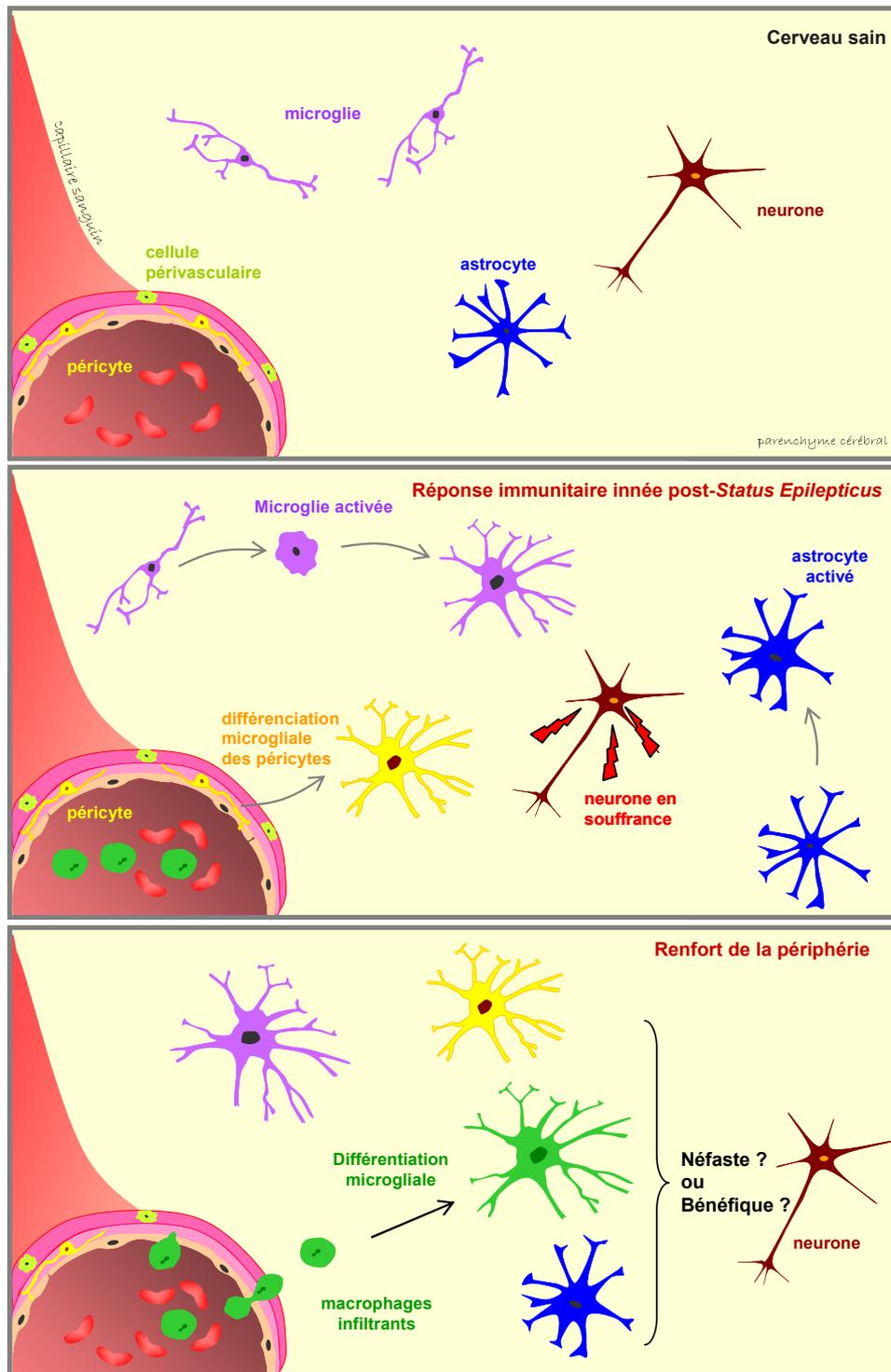


Figure 3. Localisation et activation des cellules immunitaires impliquées dans la réponse inflammatoire après le *Status Epilepticus* (SE).

**Tableau 1: Caractéristiques des cellules de l'immunité innée dans le SNC**

	Origine/ Proportion	Etat d'activation dans le cerveau sain		En réponse à une atteinte cérébrale	
		Morphologie	Fonctions	Morphologie	Fonctions
<b>cellule microgliale</b> (Streit W 1998) (Guillemin G 2004) (Nimmerjahn A 2005) (Scharwitz M 2006)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dérivées des progéniteurs myéloïdes au cours du développement embryonnaire.</li> <li>5-20 % des cellules gliales</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>forme ramifiée avec un petit corps cellulaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>maintien de l'intégrité du microenvironnement des neurones en éliminant les débris résultants de l'activité normale du SNC.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>transformation en forme amiboïde puis en cellules ramifiées avec un corps cellulaire gonflé.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>phagocytose des neurones souffrants/ morts.</li> <li>libération des molécules inflammatoires qui activent les autres cellules de l'immunité et favorisent le renfort des macrophages.</li> </ul>
<b>astrocyte</b> (Farina C 2007)	<ul style="list-style-type: none"> <li>d'origines neuroectodermiques, dérivés des cellules neurales.</li> <li>cellules gliales les plus abondantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>forme étoilée avec des prolongements qui se terminent par le « pied astrocytaire »</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>régulation de la neurotransmission.</li> <li>rôle nourricier des neurones</li> <li>constituant de la barrière hémato-encéphalique (BHE)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>forme étoilée avec un épaissement du corps cellulaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>formation de la cicatrice gliale.</li> <li>réparation tissulaire ?</li> <li>libération des molécules inflammatoires.</li> </ul>
<b>cellule périvasculaire</b> (Williams K 2001) (Bechmann I 2001) (Guillemin G 2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>dérivées des macrophages d'origine myéloïde, qui traversent les leptoméniges.</li> <li>localisées dans l'espace périvasculaire, adjacentes aux cellules endothéliales.</li> <li>faible population.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>forme ronde</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>« senseur » immunologique.</li> <li>formation de la BHE.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>forme ronde</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>phagocytose des éléments dans l'espace périvasculaire.</li> <li>Réveil du système immunitaire périphérique par la présentation d'antigènes ?</li> </ul>
<b>péricyte</b> (Thomas WE 1999) (Williams K 2001) (Guillemin G 2004)	<ul style="list-style-type: none"> <li>d'origine mésenchymateuse</li> <li>localisés à l'intérieur de la membrane basale des vaisseaux sanguins</li> <li>faible population.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>petit corps cellulaire ovale avec des prolongements qui recouvrent les capillaires sanguins</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>régulation de la fonction des cellules endothéliales.</li> <li>propriétés contractiles lui conférant un rôle dans la vasomotricité.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>formes de la microglie active ?</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>identique à la microglie active ?</li> </ul>

### III.2.a.b Les médiateurs moléculaires

La réponse inflammatoire est caractérisée non seulement par l'activation des cellules immunitaires résidentes, mais aussi par la libération de molécules inflammatoires. Les cytokines pro-inflammatoires les plus étudiées dans le cadre des atteintes cérébrales sont l'interleukine-1, l'interleukine-6 et le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  :

- La famille interleukine-1 (IL-1) est constituée de deux principales molécules agonistes, IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , d'une molécule antagoniste IL-1 Ra et de deux types de récepteurs IL-1 RI et IL-1 RII. Les cytokines IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  synthétisées sous la forme de précurseurs sont respectivement activées par la calpaïne et la caspase-1. L'IL-1 $\beta$  est la forme la plus représentée dans le milieu extracellulaire et possède une plus grande affinité que IL-1 $\alpha$  aux récepteurs IL-1 RI et IL-1 RII. La fixation des IL-1 sur leur récepteur déclenche des voies de signalisation intracellulaires qui aboutissent à la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes <sup>204</sup>.
- La famille interleukine-6 (IL-6) est principalement composée du ligand IL-6 et du récepteur IL-6R. L'IL-6 synthétisée sous la forme d'un précurseur est activée par des protéases encore non identifiées. Lorsqu'elle se fixe sur son récepteur IL-6R, elle active des voies de signalisation intracellulaires comprenant vraisemblablement STATs et certaines MAP kinases <sup>259</sup>.

- La famille du facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) comprend la molécule agoniste TNF- $\alpha$  et les récepteurs membranaires TNF $\alpha$ -RI et TNF $\alpha$ -RII. Ces récepteurs, présents également sous forme soluble, possèdent certainement un rôle de neutralisation de l'activité du TNF- $\alpha$ . Alors que l'activation de TNF $\alpha$ -RI (appelé « récepteur de la mort ») déclenche des cascades intracellulaires impliquées dans la mort cellulaire, l'activation de TNF $\alpha$ -RII permettrait de promouvoir la survie cellulaire <sup>82</sup>.

Les cytokines pro-inflammatoires sont faiblement exprimées dans le cerveau sain et leur rôle physiologique dans les conditions basales reste encore à déterminer <sup>266</sup>. En revanche, à la suite d'une agression cérébrale ou dans le cadre des neuropathologies, ces cytokines sont fortement exprimées dans les cellules gliales activées (microglie et astrocyte) et les macrophages.

**Quelques heures après un SE**, la réponse inflammatoire précoce se caractérise par une forte augmentation des transcrits de l'IL-1 $\beta$ , de l'IL-6 et du TNF- $\alpha$  dans les régions affectées <sup>49,68,180,203,251</sup>. Les protéines IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  sont détectées dans les astrocytes et la microglie activés quelques heures après le SE <sup>180,198,263</sup>. La protéine IL-1 $\beta$  est toujours fortement exprimée par les astrocytes 7 jours et 4 mois plus tard <sup>198</sup>. De plus, le récepteur IL-1 RI est exprimé essentiellement dans les astrocytes et les neurones après le SE, suggérant un rôle autocrine/ paracrine de l'IL-1 $\beta$  sur ces cellules <sup>198</sup>.

### III.2-b Réponse inflammatoire cérébrale : renfort de la périphérie

Dans certaines circonstances, la réponse immunitaire innée peut être renforcée par les cellules immunitaires périphériques qui infiltrent le parenchyme cérébral. Ainsi, les leucocytes circulant dans les capillaires sanguins traversent la BHE par le mécanisme de diapédèse afin de pénétrer dans le tissu cérébral. La libération de cytokines chimiotactiques (ou chimiokines) par les cellules microgliales et les astrocytes activés permet d'attirer les leucocytes. Le devenir des leucocytes dans le parenchyme cérébral est un sujet très difficile à aborder puisqu'il est nécessaire de les marquer afin de suivre leur évolution. Le marqueur de cellules myéloïdes le plus utilisé est la protéine fluorescente verte (GFP). Aujourd'hui, les trois modèles *in vivo* pour étudier ce domaine sont i) l'injection de monocytes marqués à la GFP, ii) la greffe de cellules de la moelle osseuse (marquées à la GFP) chez l'animal irradié (aussi appelé animal chimère) et iii) la parabiose (avec un animal transgénique dont les cellules dérivées de la moelle osseuse expriment la GFP) <sup>236</sup>. Les modèles i) et iii) présentent le désavantage de sous-estimer le nombre de cellules immunitaires qui infiltrent le parenchyme cérébral, alors que le modèle chimère aurait plutôt tendance à surestimer cette infiltration <sup>5,195,236</sup>. Quoiqu'il en soit, en utilisant l'animal chimère, l'équipe de Serge Rivest a montré que les cellules infiltrantes se différencient en cellules microgliales dans le parenchyme cérébral <sup>222</sup>. En

outre, le fait que les cellules microgliales issues des cellules infiltrantes présentent des propriétés de présentation de l'antigène plus importantes que les cellules microgliales résidentes, a conduit les auteurs à suggérer une implication des cellules infiltrantes dans une réponse immunitaire adaptative <sup>252</sup>. Les études sur les cellules infiltrantes sont principalement réalisées sur des modèles expérimentaux de maladies auto-immunes et d'ischémie cérébrale.

Dans le cadre des événements cellulaires faisant suite au *SE*, notre équipe et celle de Annamaria Vezzani ont été pionnières dans le domaine de l'infiltration des monocytes/macrophages <sup>180,198</sup>. Ces études montrent que les monocytes/macrophages pénètrent dans le parenchyme cérébral quelques heures après le *SE*. Cette infiltration est précédée par une forte augmentation de l'expression des chimiokines attractantes, suggérant un chimiotactisme positif sur les leucocytes circulants <sup>180</sup>.

### ***III.3 Réponse inflammatoire après le Status Epilepticus : Effets neurotoxiques ou neuroprotecteurs ?***

L'inflammation est un mécanisme de défense endogène qui favorise le maintien de l'intégrité du SNC. Pourtant, le fait que dans le cadre des atteintes cérébrales, la neurodégénérescence soit systématiquement associée à des processus inflammatoires <sup>223</sup>, remet en question le rôle joué par l'inflammation dans les processus de mort neuronale. Certains auteurs parlent de réponse à « double tranchant » ; la réaction du système immunitaire innée est une réponse bénéfique pour le SNC <sup>252</sup>; néanmoins, lorsque cette réaction devient disproportionnée, elle exacerberait la neurodégénérescence <sup>122,241</sup>. En outre, les effets bénéfiques ou néfastes de la réponse inflammatoire dépendent du contexte déclencheur de la réaction immunitaire. En effet, alors que dans des modèles de pathologies auto-immunes l'activation microgliale semble délétère pour le SNC, dans des modèles de maladie d'Alzheimer et d'ischémie cérébrale, cette activation permet de réduire les lésions cérébrales <sup>91</sup>. Les effets neurotoxiques de la réponse immunitaire seraient provoqués par l'action des cytokines pro-inflammatoires sur les neurones, particulièrement de l'IL-1 $\beta$  et du TNF- $\alpha$ . En effet, l'administration de ces cytokines à la suite d'une agression cérébrale augmente la mort neuronale <sup>161</sup>, alors que l'injection de molécules bloquant leur activité protège les neurones <sup>223</sup>.

Les effets des cytokines pro-inflammatoires en réponse à un *SE* ont été très peu étudiés. Pourtant, au regard de l'ampleur de la réponse inflammatoire aiguë après le *SE*, ce modèle offre de formidables perspectives d'études des effets de la réponse immunitaire sur la survie des neurones. Selon Annamaria Vezzani, le fait que les processus

inflammatoires précèdent la mort neuronale dans le modèle de *SE* indique que la réponse immunitaire a des effets neurotoxiques <sup>263</sup>. Au sein du laboratoire, nous avons récemment montré que l'administration d'un anti-inflammatoire non stéroïdien (Indométhacine®) réduit la réponse inflammatoire après le *SE*. En effet, ce traitement diminue i) le pic d'expression de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  (d' $\sim$ 60%) observé dans l'hippocampe après le *SE*, ii) l'infiltration des monocytes/ macrophages dans le parenchyme cérébral et iii) la cicatrice microgliale 15 jours après le *SE*. Pourtant, les bénéfices du traitement à l'Indométhacine® restent mitigés puisque cette molécule ne protège pas les neurones de l'hippocampe <sup>180</sup>.

### **A retenir !**

Dans le cadre du *SE*, seules quelques équipes dans le monde s'intéressent à la neuroinflammation. Quelques heures après la crise, les cellules immunitaires résidentes s'activent et expriment fortement les cytokines pro-inflammatoires. En outre, le système immunitaire inné est renforcé par les leucocytes circulants qui infiltrent le tissu cérébral. Cette réaction inflammatoire de grande ampleur, observée dans les régions cérébrales les plus lésées, suggère que le système immunitaire joue un rôle primordial dans la perte neuronale. Néanmoins, nos connaissances actuelles sur l'implication de la réponse inflammatoire cérébrale dans la neurodégénérescence provoquée par le *SE* restent à approfondir. Plusieurs questions fondamentales sont ainsi sans réponses : *Est-ce que réduire l'inflammation cérébrale est bénéfique pour la survie des neurones ? Est-ce qu'une molécule peut exercer des effets neuroprotecteurs sans moduler la réponse inflammatoire ? Quels seraient les effets d'un blocage de l'activation de la microglie et de l'infiltration des monocytes/ macrophages sur l'épileptogénèse ?*

## **PARTIE IV : LE SYSTEME EPOERGIQUE CEREBRAL ET SON IMPLICATION DANS LA PROTECTION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL**

### **IV.1 Préambule**

L'érythropoïétine (Epo), hormone sécrétée par les reins, stimule la production d'érythrocytes <sup>113</sup> en favorisant la prolifération, la survie et la différenciation des précurseurs érythroïdes <sup>187</sup>. Les effets de l'Epo sont attribués à la présence du récepteur de l'Epo (EpoR) à la surface des cellules progénitrices érythroïdes. Depuis que l'EpoR a été découvert dans d'autres cellules de l'organisme, nos connaissances sur les fonctions de l'Epo se sont considérablement étendues, au-delà de ses effets érythropoïétiques. Sa présence dans les cellules du SNC a notamment ouvert un nouveau champ d'investigation en neurobiologie, visant à caractériser les fonctions du système Epoergique dans le SNC.

### **IV.2 Le récepteur de l'érythropoïétine**

Acteur phare du système Epoergique, l'EpoR a reçu beaucoup d'attention depuis une vingtaine d'années. Ses structures génique et protéique, sa synthèse, et son devenir au sein de la cellule sont particulièrement étudiés en hématologie.

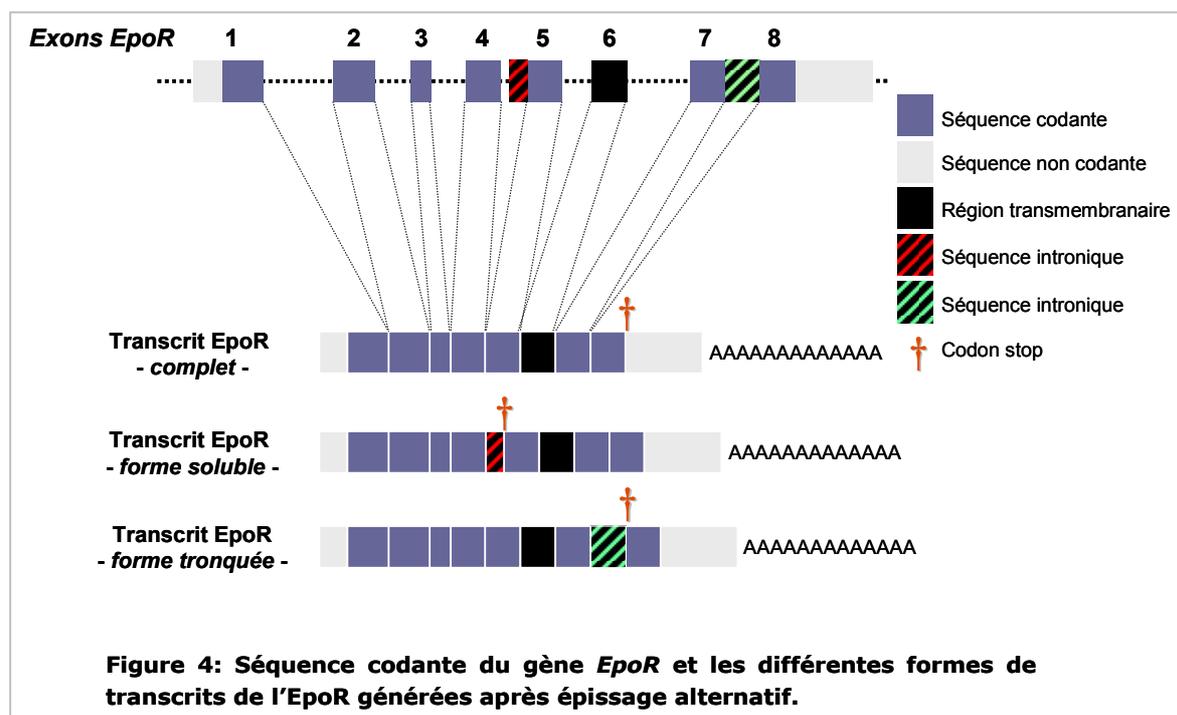
#### **IV.2.a Structure génique**

La localisation chromosomique du gène *EpoR* varie en fonction de l'espèce (voir tableau 2).

La séquence nucléotidique du gène *EpoR* chez la souris présente 81,6% d'homologie avec celle de l'humain. Le gène *EpoR* constitué de 6500 bases environ, est composé de 8 exons et 7 introns. La taille individuelle des exons et des introns ainsi que les jonctions intron-exon présentent une grande homologie entre les espèces <sup>291</sup>. Les cinq premiers exons (1-5) codent pour la partie extracellulaire de l'EpoR, l'exon 6 pour la partie transmembranaire et les exons 7-8 pour le domaine intracytoplasmique (figure 5) <sup>37</sup>. Lors de la transcription du gène, les processus d'épissages alternatifs génèrent trois formes de transcrits : la forme complète, la forme soluble et la forme tronquée (figure 4) <sup>224</sup>. Ces différences sont attribuées à l'insertion de séquences introniques en amont de l'exon 5 ou de l'exon 8 du gène *EpoR*, entraînant un décalage du cadre de lecture et l'apparition prématurée d'un codon stop.

Espèce	Gène <i>EpoR</i>	Gène <i>Epo</i>
<i>Homo Sapiens</i>	chromosome 19 19p13.3-p13.2	chromosome 7 7q22
<i>Rattus Norvegicus</i>	chromosome 8 8q13	chromosome 12 12q12-q13
<i>Mus Musculus</i>	Chromosome 9 9 5.0 cM	Chromosome 5 5 78.0 cM

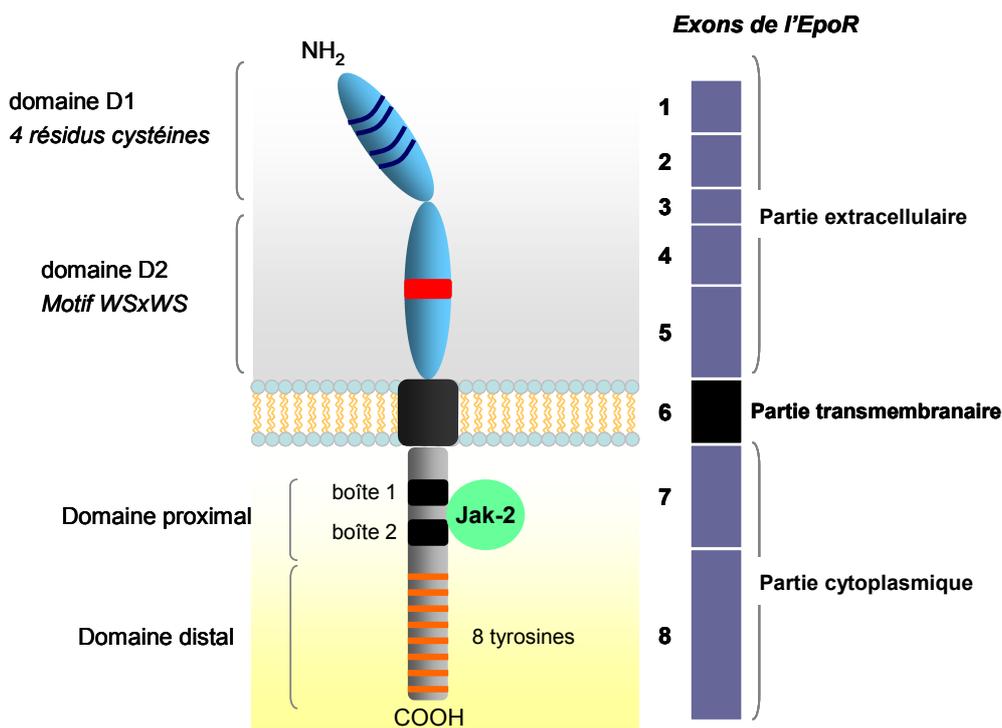
**Tableau 2: Localisation chromosomique des gènes *EpoR* et *Epo* chez l'homme, le rat et la souris (source Genbank).**



#### IV.2.b Structure protéique

La masse moléculaire de la forme complète de l'*EpoR* est de 66 kDa. Il est considéré que la forme complète de l'*EpoR* représente le récepteur responsable de la transduction du signal induite par l'*Epo*. Les formes tronquée et soluble de l'*EpoR* ne sont *a priori* pas impliquées dans la transduction du signal, leur fonction respective restant à définir. L'*EpoR* complet fait partie de la famille des récepteurs transmembranaires aux cytokines de type I. Sa partie extracellulaire comprend 230 acides aminés (aa) environ, son segment transmembranaire 20 aa et son domaine intracytoplasmique 230 aa (voir figure 5). La partie intracellulaire de l'*EpoR* est dépourvue d'activité enzymatique intrinsèque<sup>44</sup>. La partie extracellulaire est composée de 2 sous-domaines fibronectine de type III (FNIII) D1 et D2. Le sous-domaine D1 comporte une série de quatre résidus cystéines et le sous-domaine D2 comprend un motif de cinq résidus d'aa tryptophane-sérine-x-tryptophane-sérine (WSxWS, où x est un aa quelconque) impliqué dans le devenir de l'*EpoR* dans la cellule.

La partie intracytoplasmique permet la transduction du signal cellulaire après fixation de l'*Epo* sur la partie extracellulaire du récepteur. Dans la région proximale, les boîtes 1 (aa 257-264) et 2 (aa 303-313), et la région entre ces deux boîtes (aa 265-302) sont impliquées dans l'association permanente des Janus Kinases 2 (Jak-2)<sup>44</sup>. Au niveau de la région distale, huit résidus tyrosines constituent des sites d'attraction potentiels aux protéines adaptatrices « Src homology 2 » (SH2).



**Figure 5: Représentation de la structure protéique de l'EpoR et des séquences codantes correspondantes aux différentes parties de l'EpoR.**

#### IV.2.c Mécanismes de régulation transcriptionnelle de l'EpoR cérébral

Le gène *EpoR* ne possède pas de boîte TATA, généralement reconnue comme site d'initiation de la transcription. Néanmoins, la séquence promotrice située en amont de la séquence codante du gène présente deux boîtes de régulation: GATA-1 et SP1, considérées comme activatrices<sup>36</sup>. Toutefois, d'autres éléments de régulation, encore mal élucidés, seraient nécessaires au contrôle de l'expression du gène *EpoR*. Il a récemment été proposé que, dans les cellules NT2, le facteur GATA-3 puisse jouer un rôle dans l'activation de l'expression de l'EpoR<sup>292</sup>. En outre, le fait que l'ajout d'Epo sur des cellules NT2 provoque une induction de l'expression de GATA-3 suggère un rôle indirect de l'Epo dans la transcription de son récepteur.

#### IV.2.d Maturation et migration de l'EpoR : rôle des modifications post-traductionnelles

L'EpoR se différencie des autres récepteurs aux cytokines par le fait que sa présence sur la membrane cytoplasmique est faible, contrastant avec sa forte concentration dans le réticulum endoplasmique<sup>106</sup>. Cette particularité de l'EpoR suggère qu'il existe des modifications post-traductionnelles dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi qui entraîneraient non seulement la maturation de l'EpoR, mais aussi sa migration vers la membrane cytoplasmique.

Depuis une vingtaine d'années, plusieurs équipes de recherche se sont intéressées aux réactions biochimiques responsables des processus de maturation/ migration de l'EpoR dans les cellules hématopoïétiques (voir encadré 2). Les mécanismes impliqués dans le repliement de la partie extracellulaire de l'EpoR sont les pistes privilégiées pour expliquer sa maturation/ migration. En effet, des mutations du motif WSxWS du domaine extracellulaire de l'EpoR, augmentent<sup>105</sup> ou inhibent<sup>104</sup> la maturation/ migration de l'EpoR vers la surface de la cellule. En outre, la liaison de Jak-2 avec l'EpoR serait indispensable d'une part aux modifications opérées dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, et d'autre part dans le transport de l'EpoR vers la surface de la cellule<sup>106</sup>. La découverte des mécanismes impliqués dans l'augmentation ou la diminution de l'adressage de l'EpoR vers la surface d'une cellule permettrait de contrôler les capacités de réponse d'une cellule à l'Epo.

### Encadré 2. Zoom sur le Spalax Galili...

Le Spalax, appelé aussi rat taupe, est un rongeur dont la présence sur terre, ou plutôt sous terre, est estimée à 40 millions d'années (« seulement » 15 millions d'années pour la souris et le rat). Cet animal vie dans des galeries souterraines où la quantité d'oxygène est très faible. Il s'est adapté à son milieu hypoxique extrême au cours de l'évolution. Récemment, des chercheurs de l'Université de Tel Aviv ont découvert que les cellules hématopoïétiques de ces animaux présentaient une expression de l'EpoR à leur surface beaucoup plus importante que celle retrouvée à la surface des cellules hématopoïétiques de souris<sup>197</sup>. Intrigués par cette découverte, ils ont comparé les caractéristiques intrinsèques de l'EpoR du Spalax et de la souris. Ils ont démontré que l'EpoR du Spalax possédait des propriétés de maturation et de migration vers la membrane cytoplasmique plus grandes que celles de l'EpoR de souris. Ces propriétés sont assurées par une séquence de 90 acides aminés en aval du premier site de N-glycosylation, dont la séquence diffère de 12% entre la souris et le Spalax. En outre, la construction d'un EpoR mutant, composé de la partie extracellulaire de l'EpoR de Spalax et des parties transmembranaire et cytoplasmique de l'EpoR de souris, leur a permis de montrer l'implication de la partie extracellulaire de l'EpoR dans sa maturation/ migration. En effet, cet EpoR mutant transfecté à des cellules possède de meilleures propriétés de maturation/ migration que l'EpoR de souris. Dans cette élégante étude, les auteurs proposent que les différences de propriétés de l'EpoR observées chez le Spalax soient issues de processus adaptatifs mis en place en réponse à l'environnement hypoxique ; la forte présence de l'EpoR à la surface des progéniteurs érythroïdes favoriserait la production d'érythrocytes matures, et permettrait ainsi d'augmenter la capacité de transport de l'oxygène.



#### IV.2.e Modèle d'activation de l'EpoR

L'EpoR possède la particularité d'être dans une conformation pré-dimérique inactive à la surface de la cellule. Le fait que les monomères d'EpoR soient en permanence liés à la surface de la cellule permettrait une transmission efficace après fixation de l'Epo, et compenserait ainsi la faible concentration d'EpoR sur la membrane plasmique<sup>132</sup>. L'Epo se lie à cet homodimère d'EpoR au niveau de deux sites, un à haute affinité et l'autre à faible affinité. Une fois l'Epo fixé, les deux Jak-2 associées à chaque monomère s'activent

par transphosphorylation et provoquent la phosphorylation des domaines tyrosines de chaque monomère, libérant des sites de fixation pour les domaines SH2 des protéines impliquées dans la transduction du signal cellulaire <sup>44,187,208,282</sup>.

#### IV.2.f Internalisation de l'EpoR

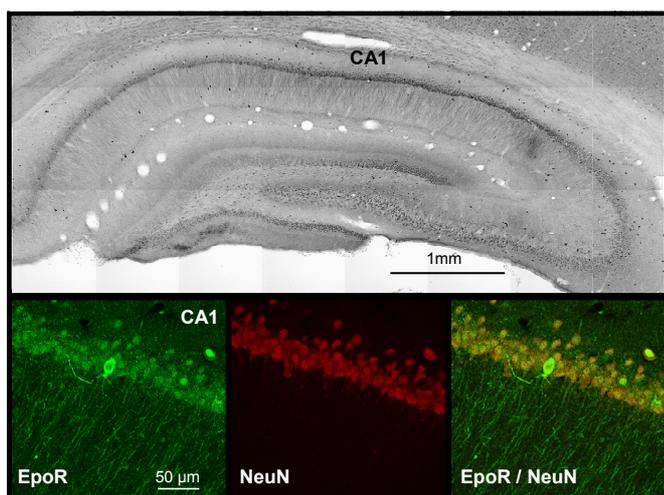
L'équipe de Patrick Mayeux a étudié les mécanismes et les caractéristiques de l'internalisation de l'EpoR sur des cultures de cellules humaines UT-7. Lorsque le ligand active l'EpoR, ce dernier se lie à une ubiquitine qui est reconnue par les protéasomes. Ces derniers dégradent le domaine intracellulaire tandis que le complexe Epo/ EpoR restant est internalisé, puis détruit par les lysosomes. En outre, ces processus de dégradation sont rapides puisqu'il faut moins de 60 minutes de traitement à l'Epo pour provoquer la dégradation de la moitié des récepteurs présents à la surface des cellules <sup>268</sup>.

#### IV.2.g Expression cérébrale de l'EpoR dans les conditions basales

**Humain.** Les études immunohistochimiques réalisées sur du tissu cérébral sain de fœtus ou d'adulte ont révélé la présence de l'EpoR dans les neurones corticaux et hippocampiques mais aussi dans les astrocytes et les cellules endothéliales <sup>9,24,58,118,225,227</sup>. *In vitro*, l'EpoR est détecté dans les neurones, la microglie, les astrocytes, et les cellules endothéliales (voir tableau 3) <sup>177</sup>.

#### L'EpoR ubiquitaire ?

Cellules stromales hépatiques <sup>189</sup>, cellules endothéliales <sup>287</sup>, cellules musculaires lisses <sup>168</sup>, cellules mésangiales <sup>168</sup>, cellules tubulaires rénales <sup>279</sup>, cardiomyocytes <sup>283</sup>, cellules de Schwann <sup>142</sup>, cellules du tissu placentaire <sup>43</sup>, cellules tumorales <sup>224</sup> sont autant de cellules où l'EpoR a été détecté chez l'homme ou chez l'animal, chez le fœtus ou chez l'adulte.



**Figure 6: Détection immunohistologique de l'EpoR dans l'hippocampe de rat adulte en condition basale.** L'EpoR est détecté dans les couches pyramidales et granulaires de l'hippocampe. Les images fluorescentes de l'EpoR et du marqueur neuronal NeuN montrent que l'EpoR est essentiellement présent dans les neurones (Illustration extraite de Nadam & al, Neurobiology of Disease, 2007).

**Animal.** L'EpoR est détecté dans le tissu cérébral et en particulier dans l'hippocampe (voir figure 6), le cortex, le striatum et le tronc cérébral chez la souris et le rat pendant la période fœtale <sup>61,146,171,250,292</sup> et la période postnatale <sup>17,18,54,57,61,85,124,159,176,191,220,233-235,238,296</sup>. Parmi ces études chez le rongeur, la plupart concorde vers une expression majoritairement neuronale, et accessoirement astrocytaire de l'EpoR <sup>18,85,124,171</sup>, toutefois certaines études détectent l'EpoR dans les cellules ependymaires <sup>85</sup> et endothéliales (voir tableau 3) <sup>287</sup>.

Dans des cultures primaires corticales de souris, les neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales expriment l'EpoR dans les conditions basales<sup>17,18</sup>. D'autres études *in vitro* mettent en évidence une expression de l'EpoR soit essentiellement dans les neurones<sup>32,56</sup> soit dans les neurones et les astrocytes<sup>61,242</sup>. En outre, l'EpoR est aussi détecté dans des cultures d'oligodendrocytes et de cellules granulaires cérébelleuses de rat<sup>121,242</sup>.

**Tableau 3: Caractérisation des cellules exprimant l'EpoR dans le SNC**

	Type cellulaire	Espèces	Sources
<i>In Vivo</i>	Neurones	humain	Juul 1998, Siren 2001, Ehrenreich 2004
		rat	Morishita 1997, Grasso 2005, Nadam 2007
		souris	Bernaudin 1999, Kilic 2005
	Astrocytes	humain	Siren 2001
rat		Grasso 2005, Nadam 2007	
souris		Bernaudin 1999	
Cellules endothéliales	rat	Yamaji 1996	
Cellules ependymaires	rat	Grasso 2005	
<i>In Vitro</i>	Neurones	humain	Nagai 2001
		rat	Digicayloglu 2001, Ehrenreich 2005, Liu 2006, Meloni 2006
		souris	Bernaudin 2000, Chen 2007
	Astrocytes	rat	Masuda 1994, Ehrenreich 2005
		souris	Bernaudin 2000
Cellules endothéliales	humain	Beleslin-Cokic 1996	
Microglie	humain	Nagai 2001	

### **A retenir !**

Dans les conditions basales, l'EpoR est présent dans de nombreuses régions du SNC chez l'humain et chez les rongeurs. En outre, les neurones et les astrocytes sont les deux principaux types cellulaires où l'EpoR a été détecté dans le tissu cérébral. En revanche, le fait que dans des conditions *in vitro*, de nombreuses cellules soient capables d'exprimer l'EpoR, suggère qu'il existe un contrôle épigénétique de l'expression du gène *EpoR in vivo*, responsable de la répression de l'expression de ce gène dans certaines cellules du SNC.

## **IV.2.h Variations de l'expression de l'EpoR dans le système nerveux central**

Plusieurs études ont mis en évidence une variation de l'expression du gène *EpoR* dans le cerveau au cours de régulations physiologiques et physiopathologiques.

### **IV.2.h.a Régulations physiologiques**

#### **IV.2.h.a.a Du développement fœtal et postnatal jusqu'au vieillissement**

Au cours de la vie embryonnaire et après la naissance, l'expression cérébrale de l'EpoR varie non seulement en terme de localisation tissulaire et cellulaire, mais également en terme de niveau d'expression. Chez l'humain comme chez l'animal, l'EpoR est détecté en grande quantité dans le SNC de l'embryon, notamment dans les zones germinales.

**Humain.** Dès la 5<sup>ème</sup> semaine du développement embryonnaire, l'EpoR est présent dans la zone germinale autour des ventricules. A partir de la 10<sup>e</sup> semaine, le récepteur est observé dans la zone sous ventriculaire d'où les cellules progénitrices pluripotentes se différencient en oligodendrocytes ou en astrocytes. A des stades embryonnaires plus tardifs, l'EpoR est surtout détecté dans les astrocytes alors qu'en période postnatale, l'EpoR est aussi présent dans d'autres cellules neurales telles que les neurones <sup>119</sup>.

**Animal.** L'EpoR est présent en grande quantité dans le cerveau (transcrit et protéine) dès les premiers stades du développement embryonnaire, puis son expression diminue progressivement quelle que soit sa forme (complète, soluble, indéfini) entre E13 et E18. L'EpoR est détecté dans le tube neural dès E7,5 puis dans l'ensemble des cellules neuro-épithéliales à E8, dans les cellules de la glie radiale à E9,5-E11 et dans les neurones à E14,5. Son expression s'effondre au cours du développement postnatal jusqu'à l'âge adulte <sup>126</sup>.

#### **IV.2.h.a.b Au cours de la différenciation neuronale**

L'équipe de Constance Noguchi a mis en évidence *in vitro* que la concentration de protéine EpoR est plus importante dans les cellules progénitrices neuronales que dans les neurones matures <sup>32</sup>. Ce résultat suggère que, à l'instar de la différenciation des cellules progénitrices myéloïdes, le niveau d'expression cellulaire de l'EpoR détermine la réponse à l'Epo à certains stades de la différenciation neuronale.

#### **IV.2.h.a.c Contraintes environnementales**

Seulement deux études *in vitro* ont mis en évidence des augmentations de l'expression de l'EpoR à la suite de modifications environnementales. Ainsi, la lignée de cellules humaines NT2 <sup>37,292</sup> et des cultures primaires de neurones de rat <sup>147</sup> exposées à un environnement hypoxique (2% d'O<sub>2</sub>) sur-expriment le gène *EpoR*. En outre, *in vivo*, une

acclimatation de 30 jours à une ambiance chaude (34°C) chez des souris augmente la concentration de la protéine EpoR dans le cortex frontal <sup>220</sup>.

#### IV.2.h.a Régulations physiopathologiques

**Humain.** Des études sur du tissu humain montrent que l'expression cérébrale de l'EpoR est modifiée chez des patients atteints de neuropathologies. Ainsi, des événements hypoxiques causés pas des troubles cardiorespiratoires entraînent une augmentation du marquage immunohistochimique de l'EpoR dans les neurones et les astrocytes. Des évènements plus graves tels que des accidents vasculaires cérébraux qui conduisent à des ischémies locales, augmentent l'expression cérébrale de l'EpoR dans les corps cellulaires et les prolongements des neurones, mais aussi dans l'endothélium vasculaire et les cellules myéloïdes localisées dans les vaisseaux sanguins <sup>227</sup>. De plus, chez des patients schizophrènes, l'intensité du marquage de l'EpoR est augmentée dans les neurones et les astrocytes de l'hippocampe et du cortex <sup>58</sup>. Une étude histologique sur des pièces réséquées de tissu cérébral de patients atteints d'épilepsie du lobe temporal montre que l'EpoR est surexprimé dans les capillaires sanguins. Ce marquage atypique est observé dans les cellules endothéliales et les « pieds » astrocytaires de l'hippocampe <sup>63</sup>. Récemment, une étude a permis d'établir des corrélations entre le diagnostic de gravité de la maladie d'Alzheimer ante mortem et le niveau d'expression de l'EpoR dans le cerveau des patients post mortem. Les patients atteints de la forme avancée de la maladie d'Alzheimer présentent le plus important niveau d'expression de l'EpoR <sup>9</sup>.

#### Problème de spécificité des anticorps de l'EpoR : Vraie ou fausse polémique ?

Les anticorps utilisés pour détecter l'EpoR dans le cerveau font l'objet de vifs débats dans la communauté scientifique <sup>65</sup>. En effet, plusieurs études mettent en doute la spécificité des anticorps anti-EpoR actuellement commercialisés. Parmi les deux principaux anticorps utilisés pour détecter l'EpoR cérébral, l'anticorps de lapin dirigé contre l'EpoR de rat (M20, Santa-Cruz, n°697) est particulièrement visé par ces critiques. Alors que cet anticorps s'est avéré approprié pour détecter l'EpoR chez l'humain et chez le rat par western blot <sup>65,125</sup>, sa spécificité *in situ* serait incertaine d'après une étude réalisée chez des souris transgéniques EpoR<sup>-/-</sup>. En effet, avec cet anticorps, un signal immunohistochimique est observé sur les coupes de cerveau des souris EpoR<sup>-/-</sup> <sup>65,125</sup>. Néanmoins, ce résultat doit être considéré avec prudence au regard de la délétion incomplète du gène *EpoR* dans ce modèle de souris. En effet, seulement les 6 premiers exons du gène *EpoR* (sur 8 exons) ont été invalidés <sup>284</sup>. Dans l'éventualité de la traduction d'une protéine chimère sur la base des exons 7 et 8 restants, un signal immunohistochimique pourrait être détecté par l'utilisation de l'anticorps M20. En effet ce dernier est directement dirigé contre un épitope codé par une séquence comprise dans les exons 7 et 8. Ainsi, cette étude sur la souris EpoR<sup>-/-</sup> ne permet pas de conclure sur la spécificité de l'anticorps anti-EpoR M20. En outre, cette spécificité a été démontrée *in situ* par la disparition du signal de détection après que M-20 ait été pré-incubé avec le peptide d'immunisation <sup>74,88</sup>.

**Animal.** Plusieurs études sur des modèles d'ischémie cérébrale chez la souris en période néonatale ou chez la souris adulte rapportent une induction du transcrite et de la protéine EpoR et une augmentation du nombre de cellules exprimant le récepteur <sup>18,233,238,244</sup>. L'élévation de l'expression de l'EpoR est en premier lieu observée dans les cellules

endothéliales et la microglie dans la zone de l'infarctus, puis dans les astrocytes dans la région autour de l'infarctus <sup>18,276</sup>. Cependant, chez le rat adulte, l'expression de l'EpoR à la suite d'une ischémie cérébrale est essentiellement neuronale <sup>157</sup>. De plus, dans des cultures primaires de rat soumis à une privation totale en oxygène, l'ARNm de l'EpoR est plus induit dans les neurones que dans les astrocytes <sup>61</sup>. Les régulations de l'expression de l'EpoR ont également été observées dans d'autres modèles de lésion tel que le traumatisme médullaire chez le rat adulte. La compression de la moëlle épinière provoque une augmentation du nombre de cellules qui expriment l'EpoR. A la suite du traumatisme, le marquage de l'EpoR devient plus intense dans les neurones et les cellules de la glie et de l'endothélium vasculaire <sup>85</sup>. L'expression de l'EpoR est aussi augmentée 12 heures après un traumatisme crânien, atteint un pic à 24h, et se maintient jusqu'au 7ième jour dans des cellules qui ressemblent à des astrocytes <sup>144</sup>. De plus, notre équipe a montré qu'à la suite d'un *Status Epilepticus* induit pharmacologiquement chez le rat, l'expression de l'EpoR est augmentée dès le premier jour, et reste supérieure à celle des témoins pendant au moins une semaine. Son expression diminue dans les neurones et augmente dans les astrocytes de l'hippocampe <sup>176</sup>. Récemment, une induction de l'EpoR a également été retrouvée dans les cellules granulaires de la rétine dans un modèle d'hypertension oculaire chez le rongeur <sup>74</sup>.

#### **IV.2.h.b Régulations provoquées pharmacologiquement**

Les neuroleptiques, médicaments utilisés dans le cadre des psychoses (schizophrénie, dépression, hallucination...), altèrent l'expression de l'EpoR. Cette découverte est issue d'une étude qui consistait à traiter des rats avec un neuroleptique : soit l'haloperidol® (ancienne génération), soit l'olanzapine® (nouvelle génération). Après 14 ou 45 jours de médication à l'olanzapine®, la synthèse de l'EpoR est augmentée dans les cellules endothéliales du striatum. Selon les auteurs, ces données suggèrent que par l'augmentation de l'expression de l'EpoR, la nouvelle génération de neuroleptique pourrait améliorer la régulation du flux sanguin dans ces régions cérébrales <sup>191</sup>.

#### **A retenir !**

L'expression de l'EpoR varie dans le SNC. Ces variations interviennent soit au cours du développement, période propice à de grands remaniements morphologiques, soit lors d'atteintes cérébrales sévères, période durant laquelle l'organisme met en place des stratégies de défense. Ces régulations d'expression du gène *EpoR* suggèrent une forte implication de ce récepteur dans la plasticité cérébrale et dans les mécanismes de protection endogène. Réussir à réveiller son expression par des situations physiologiques non délétères représente une opportunité pour approfondir nos connaissances sur les fonctions de l'EpoR. A ce jour, une seule étude *in vivo* a démontré qu'il était possible d'induire le gène *EpoR* dans le cerveau du rat en réponse à une contrainte environnementale (ambiance chaude).

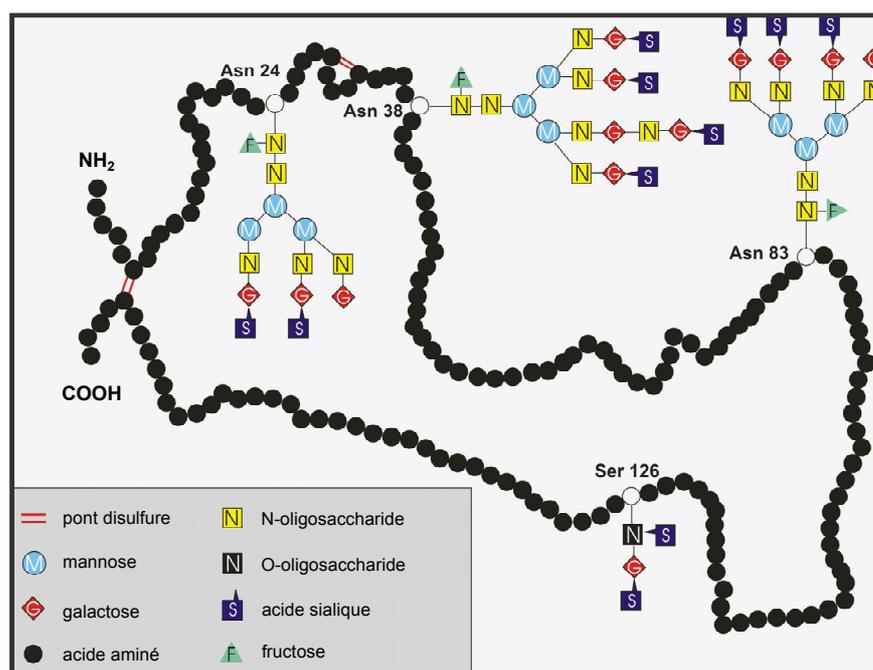
### IV.3 L'érythropoïétine

#### IV.3.a Structure génique

La localisation chromosomique du gène *Epo* varie en fonction de l'espèce (voir tableau 2). Ce gène existe sous la forme d'une seule copie et se compose de cinq exons et quatre introns. La séquence humaine du gène codant pour l'Epo présente une homologie de 92% avec celle du singe <sup>110</sup>, de 80% avec celle de la souris <sup>110</sup> et de 79% avec celle du rat <sup>178</sup>. Le séquençage du gène *Epo* humain, réalisé dans les laboratoires d'Amgen dans les années 80, a permis de produire la protéine recombinante correspondante à partir de cellules ovariennes d'hamster chinois <sup>112</sup>.

#### IV.3.b Structure protéique

L'Epo est une glycoprotéine membre de la famille des cytokines de classe I. Alors que le gène *Epo* code pour une chaîne polypeptidique de 193 aa, la forme mature du peptide, capable de lier son récepteur spécifique, contient seulement 165 aa, suggérant une régulation post-traductionnelle de l'Epo <sup>112,158</sup>. Dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi le peptide subit une glycosylation sur 4 aa différents (voir figure 7). Au final, les 4 chaînes d'hydrate de carbone représentent 40% de la molécule, et sont indispensables à la stabilisation de l'hormone <sup>111,112,158</sup>. Ainsi, la masse moléculaire de la forme mature de l'Epo est de 30,4 kDa environ <sup>110</sup>.



**Figure 7: Structure protéique de l'Epo.** La forme mature de l'Epo est composée de 165 aa et de 4 chaînes d'hydrate de carbone dont 3 complexes N-oligosaccharides liés aux résidus d'asparagine (Asn) 24, 38 et 83, et 1 complexe O-oligosaccharide lié à la sérine (Ser) 126. Les monosaccharides à l'extrémité des chaînes N-glycanes sont généralement des acides sialiques. En outre, deux ponts disulfures relient les cystéines 7 et 29 aux cystéines 161 et 33, respectivement. Le nombre et la composition des chaînes d'hydrate de carbone déterminent non seulement la stabilité de la protéine, mais aussi son affinité pour le récepteur spécifique.

### IV.3.c Expression cérébrale de l'Epo dans les conditions basales

**Humain.** A l'instar de l'EpoR, l'Epo est détectée dans le cerveau sain de fœtus<sup>118</sup> et d'adulte<sup>118,227</sup>. En outre, l'Epo est exprimée par les astrocytes dans des cultures de cellules embryonnaires humaines<sup>177</sup>.

**Animal.** L'Epo est exprimée dans le cerveau pendant la période fœtale<sup>61,250</sup> et pendant la période postnatale<sup>18,54,57,85,124,176,220,238</sup> dans plusieurs régions cérébrales. Les études sur les rongeurs concordent sur une expression de l'Epo dans les neurones<sup>18,176</sup>, même si l'Epo peut également être détectée dans quelques astrocytes (voir tableau 4). *In vitro*,

l'Epo est retrouvée essentiellement dans les neurones et les astrocytes<sup>17,61,171</sup>. Ainsi, il est intéressant de constater que l'Epo est exprimée par les deux types de cellules neurales qui expriment majoritairement l'EpoR : les neurones et les astrocytes. Cette observation suggère que l'Epo endogène aurait un rôle autocrine/paracrine sur ces populations cellulaires.

**Tableau 4: Caractérisation des cellules exprimant l'Epo dans le SNC**

	Type cellulaire	Espèces	Sources
<i>In vivo</i>	Neurones	humain	Juul 1998, Siren 2001
		rat	Grasso 2005, Nadam 2007
		souris	Bernaudin 1999
	Astrocytes	humain	Juul 1998
		rat	Grasso 2005, Nadam 2007
		souris	Bernaudin 1999
<i>In vitro</i>	Neurones	rat	Ehrenreich 2005
		souris	Bernaudin 1999/ 2000
	Astrocytes	humain	Nagai 2001
		rat	Masuda 1994, Ehrenreich 2005
		souris	Bernaudin 1999/ 2000

### IV.3.d Variations de l'expression de l'Epo dans le système nerveux central

#### IV.3.d.a Régulations physiologique et physiopathologique du gène Epo

##### IV.3.d.a.a Au cours du développement fœtal et postnatal

Comme nous l'avons vu précédemment pour l'expression du gène *EpoR* (voir paragraphe II.6.a.a), le niveau d'expression cérébrale de l'Epo, et les cellules qui l'expriment, varient au cours de la vie embryonnaire et durant la période post-natale.

**Humain.** L'équipe de Sandra Juul a été la première à caractériser l'expression de l'Epo au cours du développement du SNC chez le fœtus humain. L'Epo est détectée dès la 5<sup>e</sup> semaine gestationnelle dans la zone germinale autour des ventricules. Essentiellement détectée dans les neurones jusqu'à la 32<sup>e</sup> semaine de gestation, l'Epo est ensuite observée dans quelques astrocytes<sup>118,119</sup>.

**Animal.** Chez la souris, le profil d'expression au cours du développement du SNC possède de nombreuses similitudes avec celui du fœtus humain. En effet, le niveau d'expression de l'Epo est détecté dans diverses régions du SNC chez l'embryon de souris. Les plus forts niveaux d'Epo (transcrit et protéine) sont observés dans les zones de prolifération des cellules neurales, et plus particulièrement dans les neurones<sup>126,250</sup>. Sa concentration dans le cerveau diminue au cours de la vie embryonnaire, s'effondre après la naissance, et reste stable jusqu'à l'âge adulte<sup>61,126</sup>. Enfin, l'Epo est pratiquement indétectable dans le néocortex et l'hippocampe chez le rat âgé de 17 mois<sup>41</sup>.

#### **IV.3.d.a.b En réponse aux contraintes environnementales**

Les manipulations des conditions environnementales chez l'animal peuvent moduler l'expression cérébrale de l'Epo. A ce jour, seulement une condition physiologique non pathologique a permis d'élever le niveau d'expression de l'Epo dans le cerveau : l'exposition hypoxique aiguë. En effet, il a été montré chez la souris qu'une exposition hypoxique à 8% d'O<sub>2</sub> augmentait fortement l'expression de l'ARNm de l'Epo dès 1 heure après le début de la séance d'hypoxie<sup>19</sup>. En outre, lorsque l'hypoxie est maintenue 5 ou 6 heures, le niveau d'expression de l'ARNm, très élevé à la fin de la séance, s'effondre seulement une heure après le début de la ré-oxygénation<sup>19,192</sup>. L'augmentation de la concentration de la protéine est observée 24 heures après la fin de la séance<sup>19</sup>.

#### **IV.3.d.a.c En réponse à des agressions cérébrales**

**Humain.** Alors que plusieurs études se sont intéressées aux altérations d'expression de l'EpoR dans le tissu cérébral humain pathologique, les variations d'expression de l'Epo ont reçu moins d'attention. En effet, une seule étude a montré des modifications du patron d'expression de l'Epo chez des victimes d'un accident hypoxique cardiovasculaire ou d'un accident vasculaire cérébral. A la suite d'une ischémie cérébrale, le marquage immunohistochimique de l'Epo devient beaucoup plus intense dans les neurones autour de la zone lésée. En outre, l'endothélium vasculaire, les cellules périvasculaires et les astrocytes qui n'expriment pas (ou peu) l'Epo dans les conditions non pathologiques, présentent un marquage très intense à l'Epo dans cette même région, quelques jours après l'accident<sup>227</sup>.

**Animal.** Les altérations de l'expression de l'Epo dans les modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale sont similaires à celles observées dans le tissu humain. Une ischémie cérébrale chez le rongeur provoque une élévation du marquage de l'Epo<sup>244</sup> dans les neurones, les astrocytes, la microglie activée et l'endothélium vasculaire localisés autour de la région lésée<sup>18,157</sup>. De plus, dans des cultures primaires de rat soumis à une privation totale en oxygène, l'ARNm de l'Epo est induit dans les neurones et les astrocytes<sup>61</sup>. Dans le cadre des traumatismes de la moëlle épinière et de

l'encéphale, l'expression du gène *Epo* est augmentée quelques heures après le choc, et la protéine est principalement retrouvée dans les neurones et les capillaires sanguins<sup>85,144</sup>. En outre, le nombre de cellules exprimant l'Epo augmente d'environ 1000% autour de la lésion médullaire<sup>85</sup>. Dans le modèle de *SE* induit par pilocarpine, notre équipe a montré une augmentation de l'ARNm de l'Epo 2 jours après le *SE*, et une modification du patron d'expression de l'Epo, passant d'une expression neuronale à une expression principalement astrocytaire<sup>176</sup>. Enfin, dans un modèle de glaucome, l'Epo est fortement augmentée dans les cellules de la rétine<sup>74</sup>.

#### **IV.3.d.b Régulation transcriptionnelle de l'Epo : implication de HIF-1.**

Le facteur de transcription HIF-1 (pour *Hypoxia Inducible Factor-1*), activé par l'hypoxie et par d'autres facteurs, tels que le stress oxydatif, contrôle l'expression de nombreux gènes, dont l'Epo<sup>219</sup>.

##### **IV.3.d.b.a Présentation de HIF-1**

L'hétérodimère HIF-1 est composé de 2 sous-unités HIF-1 $\alpha$  (~120 kDa) et HIF-1 $\beta$  (~91kDa). Chacune des 2 sous-unités est une protéine dont la conformation en « hélice-boucle-hélice » favorise non seulement leur dimérisation mais aussi leur liaison sur l'ADN<sup>215</sup>. Une fois que les deux sous-unités sont liées dans le noyau cellulaire, le complexe se fixe à une séquence spécifique de l'ADN appelée HRE (pour *Hypoxia Responsive Element*). HIF-1 régule la transcription de nombreux gènes (plus de 70) qui sont notamment impliqués dans les adaptations à l'hypoxie<sup>219</sup>. HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  sont exprimées de manière constitutive dans l'organisme. Le niveau de HIF-1 $\beta$  ne varie pas en réponse à l'hypoxie, par contre, le niveau de HIF-1 $\alpha$  très faible en condition normoxique, augmente sensiblement dès que la teneur en oxygène diminue<sup>219</sup>. HIF-1 $\alpha$  possède des homologues HIF-2 $\alpha$  et HIF-3 $\alpha$  dont les rôles ne sont pas encore complètement définis aujourd'hui<sup>113</sup>. Dans une élégante étude, l'équipe de Juan Chavez a montré que dans des cultures d'astrocytes soumis à une hypoxie, HIF-2 $\alpha$  et non HIF-1 $\alpha$  était responsable de la transcription de l'Epo<sup>29</sup>.

##### **IV.3.d.b.b Concordance spatiale et temporelle de l'activation de HIF-1 et de l'expression du gène Epo**

Une exposition hypoxique de 5-6 heures à 8% d'O<sub>2</sub> chez la souris entraîne une élévation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  dans le cerveau, qui perdure 24 heures après la ré-oxygénation<sup>19,192</sup>. De plus, après l'hypoxie, la liaison du complexe HIF-1 sur le promoteur HRE est augmentée, suggérant une activité transcriptionnelle accrue de HIF-1<sup>192</sup>. L'augmentation de l'expression du gène *Epo* est observée simultanément à l'augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$ , et reste détectable 72 heures après la fin de l'hypoxie<sup>19,192</sup>. En outre, à la suite d'un *SE*, nous avons montré que l'augmentation de l'expression du

transcrit HIF-1 $\alpha$  d'une part et la réduction de l'antisens naturel aHIF d'autre part, précèdent l'augmentation de l'expression de l'Epo dans l'hippocampe <sup>176</sup>. Ces données suggèrent donc que la régulation de l'expression de l'Epo passe aussi par une régulation transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$ .

### **A retenir !**

L'expression de l'Epo varie dans le SNC durant les périodes de développement, en réponse à des contraintes environnementales, et en réaction à des agressions diverses. Parmi l'ensemble des études qui ont mis en évidence des augmentations de l'Epo cérébrale chez l'adulte, la plupart présentent une caractéristique commune, la diminution de l'apport en oxygène vers le SNC. Le gène *Epo* est en effet régulé par le facteur de transcription HIF-1, qui est activé en situation d'hypoxie. En outre, comme nous l'avons déjà remarqué pour l'EpoR, le patron d'expression de l'Epo est modifié en réponse à un stress. Ainsi, alors que dans les conditions basales l'Epo est principalement détectée dans les neurones, en réponse à des perturbations de l'homéostasie tissulaire, l'Epo devient fortement exprimée par les astrocytes et les cellules endothéliales.

## **IV.4 Fonctions du système Epoergique cérébral**

Les variations d'expression d'un gène sont le reflet d'une recrudescence ou au contraire d'une diminution de l'implication fonctionnelle de ce gène. Ainsi, l'altération de l'expression des gènes *Epo* et *EpoR* dans le SNC au cours du développement, en réponse à une contrainte environnementale ou à la suite d'une agression, remet en question les rôles joués par les acteurs du système Epoergique dans ces divers contextes. L'étude *in vivo* des fonctions de l'Epo (endogène) et de son récepteur dans le SNC est très difficile car elle requière des moyens d'invalider, de neutraliser ou d'augmenter les actions biologiques du système Epoergique endogène. A ce jour, les modèles de souris transgéniques KO-*epor* (voir encadré 3) et le modèle de neutralisation de l'activité biologique de l'Epo endogène <sup>221</sup> par infusion intracérébrale d'un anticorps anti-Epo, ont permis de démontrer les rôles de l'Epo endogène dans le contrôle de la migration, la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales <sup>32,221</sup>. En outre, la vulnérabilité cérébrale à l'ischémie et à la toxicité glutamatergique augmente chez les animaux i) dont l'activité biologique de l'Epo endogène est réduite par injection intracérébroventriculaire de la fraction soluble de l'EpoR <sup>207</sup>, ii) dont le gène *epor* est réprimé par transgénèse (voir encadré 3) <sup>32</sup>. De plus, l'équipe de Max Gassmann a montré que des souris transgéniques qui sur-expriment le gène *epo*, présentent une plus grande robustesse cérébrale à l'ischémie que des souris sauvages <sup>124</sup>. L'ensemble de ces résultats démontre le rôle de protection endogène joué par le système Epoergique. Les

augmentations de l'expression cérébrale des gènes Epo et EpoR en réponse à des agressions du SNC traduiraient donc un mécanisme endogène de défense (voir paragraphe IV.2.h.a).

Finalement, nous verrons dans le prochain chapitre que nos connaissances sur les fonctions du système Epoergique dans le SNC proviennent en grande majorité des observations effectuées chez des animaux où la concentration d'Epo cérébrale a été augmentée par un apport exogène d'Epo.

### **Encadré 3. Souris KO à l'Epo ou à l'EpoR : progrès et limites.**

L'invalidation de l'expression des gènes *epo* ou *epor* par transgenèse est problématique puisque le système Epoergique est impliqué dans un processus physiologique vital, l'érythropoïèse. Ainsi, les souris homozygotes *KO-epo* ou *KO-epor* ne sont pas viables et meurent au 13<sup>e</sup> jour de la période embryonnaire<sup>284</sup>.

Afin de pallier à cette difficulté, l'équipe de Tom Carmichael a développé un modèle de souris TG *KO-epor* conditionnel viable, où le gène *epor* est réprimé dans les cellules exprimant la GFAP, soit les astrocytes et les précurseurs neuraux<sup>250</sup>. Ce modèle est intéressant afin d'étudier les effets du système Epoergique sur la neurogenèse. Néanmoins, le fait que l'expression constitutive de l'EpoR soit neuronale, ne permet pas l'utilisation d'un tel modèle TG pour étudier les fonctions de l'Epo sur la neuroprotection.

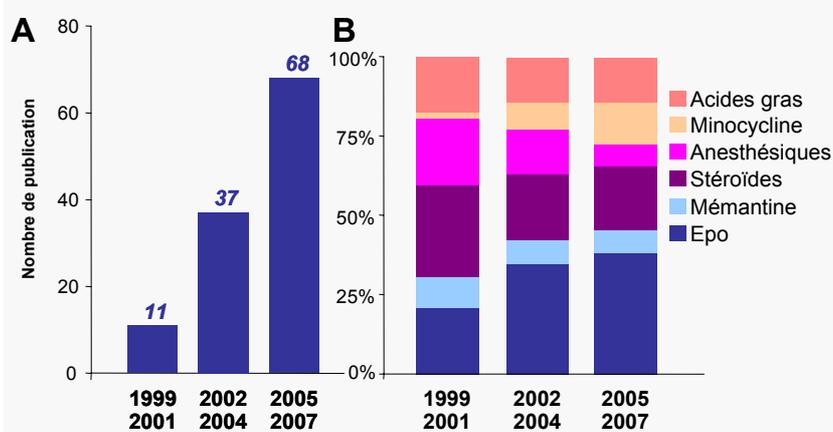
Le modèle de souris TG conditionnelle *KO-epor* le plus convaincant est celui développé par l'équipe de Constance Noguchi<sup>32</sup>. Dans ce modèle, le gène *epor* de la souris est remplacé par le gène *epor* humain.

Puis, le gène *epor* humain est inactivé par l'insertion en amont de l'intron 7, d'une cassette possédant 2 sites Loxp à ses extrémités. La souris hétérozygote est alors croisée avec une souris TG exprimant l'enzyme recombinaise sous la dépendance du promoteur de Tie2 (Tie2 étant une protéine kinase spécifiquement exprimé par les cellules endothéliales). Ainsi, chez ces souris, l'expression de l'enzyme recombinaise dans les cellules qui expriment Tie2, entraîne l'excision de la cassette, et donc l'expression de l'*epor* humain. Au final, les souris homozygote Tie2-recombinaise-*epor* n'expriment l'*epor* que dans les cellules dérivées de l'endothélium de l'embryon, telles que les cellules hématopoïétiques. Ces souris TG présentent donc une érythropoïèse normale et représentent un modèle intéressant pour étudier l'ensemble des fonctions non-hématopoïétiques du système Epoergique. Néanmoins, étant donné que l'expression de l'EpoR est réprimée dans toutes les cellules neurales, ce modèle n'offre pas la possibilité de distinguer la fonction de l'Epo entre les différents types cellulaires

## PARTIE V : ESPOIRS THERAPEUTIQUES DE L'EPO EXOGENE

### V.1 Préambule

L'Epo et son récepteur sont exprimés par les neurones du SNC. L'activation du récepteur par la fixation de son ligand naturel Epo favorise la survie neuronale et confère au système Epoergique un rôle de protection endogène du SNC. L'étude pionnière de Sakanaka a montré que ce système endogène permettait de protéger le cerveau contre des atteintes cérébrales légères, mais pas contre des atteintes cérébrales sévères<sup>207</sup>. La communauté scientifique a donc émis l'hypothèse que la quantité cérébrale d'Epo endogène n'était pas suffisante pour contrecarrer les effets délétères associés à des agressions sévères du SNC. Il a donc été envisagé de suppléer au déficit ou à la faible expression de l'Epo endogène, par un apport exogène de la même molécule. En seulement une dizaine d'années, le nombre d'études sur les effets neuroprotecteurs de l'Epo exogène a « explosé » et dépasse aujourd'hui largement le nombre d'étude sur les autres agents neuroprotecteurs (voir figure 8): simple effet de mode, ou molécule véritablement prometteuse?



**Figure 8: Analyse bibliométrique sur les agents neuroprotecteurs.** (A) Évolution du nombre de publications sur les effets neuroprotecteurs de l'Epo depuis 1999. (B) Proportion des publications sur les différents agents (ou famille d'agent) neuroprotecteurs depuis 1999. L'étude bibliométrique a été réalisée sur *The Web of Sciences*, en utilisant l'équation: « neuroprotection » + « brain » + « nom de l'agent neuroprotecteur ». Seuls les articles scientifiques ont été retenus pour l'analyse.

### V.2 Les Epo de synthèse

Le séquençage du gène *Epo* humain découvert dans les années 80 a permis la production d'Epo recombinante humaine. En effet, une fois transfecté dans des cellules (par exemple, des cellules ovariennes de hamster chinois), le gène *Epo* humain est transcrit et traduit en protéine. A l'heure actuelle, il existe plusieurs formes d'Epo de synthèse dont les principales sont l'Epoétine ( $\alpha$  et  $\beta$ ) et la Darbépoétine qui se distinguent par leur structure peptidique. Le nombre d'acides aminés (165) et le nombre de sites de glycosylation (4) de l'Epoétine et de l'Epo endogène sont identiques, mais les compositions moléculaires de leurs terminaisons N-glycanes diffèrent<sup>111</sup>. En revanche, la

Darbépoétine qui présente 2 chaînes d'hydrate de carbone et 8 acides sialiques supplémentaires par rapport à l'Epo endogène a un poids moléculaire de 38,5 kDa (versus 30,4 kDa pour l'Epo et l'Epoétine). Ainsi, alors que la stabilité plasmatique et l'affinité à l'EpoR sont similaires entre l'Epo et l'Epoétine (demi-vie plasmatique de 4 à 8 heures environ), la Darbépoétine présente une stabilité plus importante (demi-vie plasmatique de 24 heures environ) et une affinité pour le récepteur réduite par rapport à l'Epo endogène <sup>111</sup>. Ces molécules largement utilisées en clinique afin de stimuler l'érythropoïèse chez les patients anémiques possèdent différentes appellations : Eprex, Epogen, Procrit pour l'Epoétine et Aranesp pour la Darbépoétine. Dans le cadre des études sur les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH, l'Epoetine est la molécule la plus utilisée.

**Encadré 4. Différencier l'Epo endogène de l'Epo exogène : mission de la lutte anti-dopage !**

L'Epo est certainement l'hormone la plus connue du grand public. Malheureusement, cette notoriété acquise lors de grandes manifestations sportives est la conséquence de l'usage illicite de cette hormone par de nombreux sportifs. En augmentant la capacité de transport de l'oxygène par une production accrue d'érythrocytes, l'EpoRH améliore les performances aérobies des athlètes <sup>64</sup>. Alors que d'autres substances illicites utilisées dans le milieu sportif sont facilement détectables dans les urines et le sang, la détection de l'EpoRH a posé beaucoup de problèmes aux chercheurs des laboratoires anti-dopages.

En effet, le fait que les structures peptidiques de l'Epo endogène et des Epo recombinantes humaines soient similaires a rendu longtemps difficile la différenciation de ces deux molécules. Néanmoins, depuis les années 2000, les chercheurs du laboratoire anti-dopage ont élaboré une technique d'électrophorèse qui a permis de différencier l'Epo endogène de l'Epo exogène <sup>135</sup>. Les différences de nombre d'acides sialiques à l'extrémité des chaînes N-glycanes de l'Epo expliquent les variations de propriétés électrophorétiques. Cette technique permet donc aujourd'hui de détecter avec une grande fiabilité l'Epo d'origine exogène dans l'urine des sportifs.

### **V.3 Perméabilité des barrières du SNC à l'Epo exogène**

Afin d'exercer un quelconque effet neuroprotecteur, une molécule administrée par voie périphérique doit nécessairement infiltrer le parenchyme cérébral. L'insuccès dans la recherche d'agents neuroprotecteurs s'expliquerait en grande partie par l'incapacité des molécules à infiltrer le tissu cérébral <sup>183</sup>. Dans le SNC, plusieurs barrières contrôlent les échanges de molécules entre le sang et le parenchyme cérébral. Ces échanges sont directs entre les vaisseaux sanguins et le parenchyme cérébral, ou indirects entre les vaisseaux sanguins et le liquide céphalo-rachidien (LCR). Dans ce dernier cas, les échanges ont lieu au niveau des méninges (espace sous-arachnoïdien) et des plexus choroïdes. Les molécules présentes dans le LCR doivent ensuite traverser les cellules épendymaires pour atteindre le tissu cérébral <sup>1</sup>.

Plusieurs études ont montré que l'EpoRH passe les barrières du SNC. En effet, quelques heures après son administration périphérique, l'EpoRH est retrouvée dans le LCR et le tissu cérébral chez l'animal <sup>6,24,117,162,176,244</sup> et chez l'homme <sup>60</sup>. La cinétique de passage de l'EpoRH dépend de 3 facteurs principaux : le mode d'administration, les régions cérébrales et l'intégrité des barrières.

- La comparaison des cinétiques de passage de l'EpoRH à travers les barrières du SNC selon les modes d'administration montre que la voie intraveineuse (i.v.) est préférable aux voies intrapéritonéale (i.p.) et sous cutanée (s.c.). En effet, la voie i.v. permet d'atteindre des concentrations élevées d'EpoRH dans le LCR plus rapidement que la voie i.p. <sup>117</sup>; et l'EpoRH injectée par voie i.p. traverse en plus grande quantité les barrières par rapport à la voie s.c. <sup>239</sup>.
- La perméabilité sélective des barrières du SNC n'est pas homogène dans toutes les régions cérébrales <sup>78</sup>. Ainsi, les concentrations tissulaires en EpoRH à la suite d'une injection chez le rat sont plus importantes dans le néocortex que dans l'hippocampe <sup>176</sup>, suggérant un passage de l'EpoRH facilité dans la structure corticale.
- Les agressions cérébrales entraînent une rupture des barrières du SNC, et augmentent considérablement les échanges réciproques entre le sang et le parenchyme cérébral. A la suite d'une atteinte cérébrale, l'EpoRH infiltre plus vite et en plus grande quantité le tissu cérébral <sup>176,239</sup>.

Certains mécanismes de passage des molécules à travers les barrières ont déjà été caractérisés <sup>1</sup>: i) la diffusion entre les jonctions cellulaires pour les molécules stables et hydrosolubles, ii) la diffusion à travers les cellules constituant les barrières pour les petites molécules lipophiles, iii) le passage à travers les cellules par des protéines de transport pour des molécules de taille moyenne, et iv) pour les molécules de grande taille (par exemple, les glycoprotéines), la transcytose contrôlée ou non par un récepteur spécifique (sur lequel la molécule se fixe), qui consiste à incorporer la molécule dans la cellule via un endosome, puis à libérer cette molécule par exocytose dans le tissu cérébral.

Pour le passage de l'EpoRH à travers les barrières, le mécanisme de transcytose a été proposé <sup>22</sup>. En effet, la présence massive de l'EpoR à la surface et dans des vésicules cytoplasmiques des cellules endothéliales du SNC <sup>24,63</sup> indique que le transfert de l'EpoRH plasmatique vers le parenchyme cérébral pourrait avoir lieu par transcytose. Ainsi, l'EpoRH pourrait se fixer sur l'EpoR à la surface luminaire des cellules endothéliales, traverser le cytoplasme dans un endosome, et être libérée par exocytose à la surface abluminale. En outre, une étude sur un modèle de BHE *in vitro* a mis en évidence que i) l'EpoR à la surface des cellules endothéliales était nécessaire au passage de l'EpoRH à

travers cette BHE et que ii) ce passage impliquait un mécanisme saturable, ce qui est en faveur d'une transcytose contrôlée par un récepteur <sup>160</sup>. Néanmoins, une étude *in vivo* utilisant de l'EpoRH radiomarquée contredit les résultats précédents en montrant que le mécanisme par lequel l'EpoRH passe les barrières du SNC n'est pas saturable, et ne peut donc pas être contrôlé par un récepteur <sup>12</sup>. Les auteurs proposent que l'EpoRH puisse traverser les barrières de la même manière que l'albumine, en empruntant la voie extracellulaire, entre les cellules endothéliales <sup>12</sup>.

Au regard de ces résultats contradictoires, il apparaît difficile de trouver un consensus sur les mécanismes d'entrée de l'EpoRH plasmatique dans le parenchyme cérébral. En revanche, il est largement démontré que l'EpoRH traverse les barrières du SNC en quantité suffisante pour exercer ses effets neuroprotecteurs.

## V.4 Mise en évidences des effets neuroprotecteurs de l'EpoRH

### V.4.a Etudes chez l'animal

**Préambule.** Les effets neuroprotecteurs du traitement à l'EpoRH ont la plupart du temps été obtenus avec des protocoles d'injections d'EpoRH post-agression cérébrale (voir encadré 5). Dans les paragraphes suivants, nous ne mentionnons pas les rares études dans lesquelles l'EpoRH est administrée avant l'agression cérébrale, car il semble que ces études soient moins pertinentes dans la perspective d'un traitement thérapeutique à la suite d'accidents imprévisibles, ou après l'émergence de maladies neurologiques.

*In vitro*, l'EpoRH protège les neurones et certaines lignées cellulaires de multiples stimuli nocifs (voir Tableau 5). En outre, de très nombreuses études sur l'animal, essentiellement réalisées chez le rongeur, ont démontré les effets neuroprotecteurs d'un traitement à l'EpoRH à la suite d'une atteinte cérébrale (voir Tableau 6). Alors que la majorité de ces études s'est intéressée aux effets neuroprotecteurs de l'EpoRH dans des

Tableau 5: Études <i>in vitro</i> sur les effets neuroprotecteurs de l'Eporh		
Types de cellule	Agents/ conditionnements toxiques	Références
Cultures primaires de neurones	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hypoxie, anoxie</li> <li>Excitotoxicité: glutamate, AMPA, NMDA, oxyde nitrique, <math>\beta</math>-amyloïde, acide kainique</li> <li>Privation de sérum</li> </ul>	Morishita 1997 Sakanaka 1998 Lewczuk 2000 Sinor 2000 Siren 2001 Digicaylioglu 2001 Chong 2003 Chong 2005
Lignée de cellule microgiale EOC2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Privation d'oxygène et de glucose</li> </ul>	Chong 2006
Lignée de cellule PC12	<ul style="list-style-type: none"> <li>Privation de sérum</li> <li>MPP: 1-méthyl-4-phenylpyridium</li> </ul>	Koshimura 1999 Wu 2007
Lignée de cellule SH-SY5Y	<ul style="list-style-type: none"> <li>Staurosporine</li> </ul>	Um 2007

modèles d'accidents cérébraux aigus (ischémie et traumatisme du SNC), peu d'attention a été accordée aux modèles de neuropathologies chroniques telles que la maladie de Parkinson ou les scléroses multiples (voir Tableau 6). En outre, à ce jour, aucun résultat n'est publié sur les effets de l'EpoRH dans des modèles de maladies d'Alzheimer et d'Huntington.

Le traitement à l'EpoRH réduit les lésions tissulaires engendrées par multiples modèles d'accidents cérébraux. En effet, plusieurs résultats montrent que 24 heures après une ischémie cérébrale, le volume lésionnel est diminué de manière spectaculaire par le traitement à l'EpoRH<sup>18,293</sup>. La protection tissulaire n'est pas transitoire puisqu'elle est encore observée 7 jours<sup>27</sup>, 14 jours<sup>14</sup> et 42 jours<sup>81</sup> après l'ischémie. Cette protection s'accompagne d'un sauvetage des neurones de l'hippocampe<sup>207,277,278,295</sup> et du néocortex<sup>226</sup>. En ce qui concerne les traumatismes physiques du SNC, les résultats sont également encourageants puisque le traitement à l'EpoRH réduit la perte cellulaire<sup>289</sup> ainsi que le volume de la nécrose tissulaire<sup>24,84</sup> dans les dix jours suivant le traumatisme. A plus long terme (9 mois), l'EpoRH prévient non seulement l'atrophie du cerveau mais également l'hypertrophie des ventricules cérébraux<sup>228</sup>.

**Tableau 6: Études *in vivo* sur les effets neuroprotecteurs de l'Eporh**

Modèles expérimentaux	Effets neuroprotecteurs observés	Références	
Ischémie	<i>adulte</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réduction des lésions tissulaires</li> <li>• Amélioration de la récupération des fonctions cognitives</li> </ul>	Sakanaka 1998 Sadamoto 1998 Bernaudin 1999 Calapai 2000 Brines 2000 Siren 2001 Celik 2002 Junk 2002 Wang 2004 Belayev 2005 Yu 2005 Zhang 2006 Zhang 2007 Wang 2007
	<i>jeune</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réduction des lésions tissulaires</li> <li>• Amélioration de la récupération des fonctions cognitives</li> </ul>	Kumral 2003 Spandou 2004 Demers 2005 Sola 2005 Wen 2006 Kellert 2007 Gonzalez 2008 Iwai 2008
Traumatismes crâniens	<ul style="list-style-type: none"> <li>• protection des axones et des neurones</li> <li>• stimulation de la neurogenèse</li> <li>• meilleur recouvrement des fonctions cognitives</li> </ul>	Brines 2000 Lu 2005 Yatsiv 2005 Siren 2006 Cheriai 2007 Grasso 2007 Mahmood 2007 Shein 2008	
Traumatismes de la moelle épinière	<ul style="list-style-type: none"> <li>• protection de la substance blanche</li> <li>• protection des neurones des ganglions spinaux</li> <li>• amélioration des performances motrices</li> </ul>	Gorio 2002 Campana 2003 Leist 2004	
Épilepsie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• protection des neurones de l'hippocampe</li> <li>• réduction de la récurrence des crises spontanées</li> </ul>	Nadam 2007 Chu 2008	
Parkinson	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protection des neurones dopaminergiques</li> <li>• réduction des séquelles cognitives</li> </ul>	Kanaan 2006 Xue 2007	
Encéphalo-myélite	<ul style="list-style-type: none"> <li>• réduction de la démyélinisation</li> <li>• diminution de la sévérité des symptômes</li> </ul>	Brines 2000 Li 2004 Zhang 2005	
Sclérose	<ul style="list-style-type: none"> <li>• augmentation de la survie et du fonctionnement des neurones rétiniens</li> </ul>	Sattler 2004	

La plupart des modèles d'accidents du SNC provoquent des séquelles cognitives chez l'animal. L'étude des effets de l'EpoRH sur la récupération des fonctions cognitives a montré qu'à la suite d'une ischémie cérébrale ou d'un traumatisme crânien, les animaux bénéficiant d'un traitement à l'EpoRH récupèrent plus rapidement leurs capacités

(sensori) motrices <sup>14,271</sup> et leur capacité de mémorisation spatiale <sup>152,228,289</sup>. En outre, 9 mois après un traumatisme cortical, les souris traitées à l'EpoRH présentent un comportement moins anxieux que les souris traumatisées sans traitement <sup>228</sup>. Au regard de ces études, il apparaît que la réduction des lésions tissulaires et cellulaires du SNC est associée à un meilleur recouvrement des fonctions cognitives.

#### **Encadré 5. Traitement neuroprotecteur à l'EpoRH : dose, fenêtre temporelle et mode d'injection**

Aujourd'hui, trouver un consensus sur un protocole d'administration de l'EpoRH semble difficile puisque divers protocoles sont efficaces. Plusieurs modes d'administration ont ainsi montré des effets neuroprotecteurs de l'EpoRH comme la voie intrapéritonéale <sup>176</sup>, la voie intraveineuse <sup>141</sup> et la voie intranasale <sup>293</sup>. L'injection d'EpoRH par la voie intracérébroventriculaire est également protectrice <sup>207</sup>, mais est moins intéressante dans une perspective d'application clinique. En ce qui concerne la dose optimale d'EpoRH, des études pionnières indiquent que les protections tissulaire et cellulaire augmentent lorsque les quantités d'EpoRH sont elles-mêmes augmentées <sup>27,207</sup>. A ce jour, la dose de 5000 U/kg par injection périphérique est la dose privilégiée pour obtenir des effets neuroprotecteurs sans perturber durablement l'hématopoïèse <sup>228</sup>. De plus, parce que la répétition des injections permet d'obtenir de meilleurs effets neuroprotecteurs <sup>27</sup>, dans la plupart des études, l'EpoRH est administré à plusieurs reprises. En outre, la première injection d'EpoRH doit avoir lieu dans les 6 heures après l'agression cérébrale pour protéger efficacement le cerveau <sup>24,34</sup>.

#### **Le cas du SE...**

Notre équipe est la première à avoir étudié les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH dans un modèle de SE. Nous avons montré que 15 jours après le SE induit par injection de pilocarpine, les rats adultes traités à l'EpoRH (post-traitement et pré/post-traitement) présentaient une protection presque totale des neurones de l'hippocampe <sup>176</sup>. Récemment, une étude a confirmé les effets protecteurs de l'EpoRH dans l'hippocampe à la suite d'un modèle de SE <sup>40</sup>. De plus, les auteurs reportent que le traitement à l'EpoRH après le SE réduit la récurrence des crises spontanées de l'hippocampe <sup>40</sup>, suggérant un rôle anti-épileptogène de l'EpoRH. Au regard de cette dernière étude, il semblerait que l'EpoRH protège également les neurones du cortex piriforme. En plus de son rôle neuroprotecteur, l'EpoRH administrée avant le SE modifie le seuil d'hyperexcitabilité. En effet, nous avons mis en évidence qu'un pré-traitement à l'EpoRH réduisait d'une part le nombre d'animaux développant un SE, et d'autre part la sévérité des crises lors du SE <sup>176</sup>. Des données semblables avaient déjà été obtenues, montrant que le pré-traitement à l'EpoRH chez des rongeurs augmentait le seuil d'hyperexcitabilité, diminuait la sévérité des crises et réduisait la mortalité <sup>24,257</sup>. En outre, le traitement à l'EpoRH avant le SE préserve l'intégrité de la BHE <sup>257</sup>.

#### V.4.b Etudes chez l'humain

Les études cliniques sur les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH ont été initiées il y a une dizaine d'années par Hannelore Ehrenreich à l'institut Max Planck de Médecine Expérimentale (Goettingen). A ce jour, ces études réalisées chez des patients victimes d'accidents vasculaires cérébraux (AVC)<sup>60</sup>, des patients ayant développés une sclérose multiple<sup>59</sup> et des patients schizophrènes<sup>62</sup> ont contribué à donner une dimension réaliste à tous les résultats prometteurs obtenus chez l'animal.

Les patients victimes d'un AVC ont bénéficié d'une injection quotidienne (33 000 U en intraveineuse) pendant les 3 jours consécutifs à l'AVC. Au regard des multiples paramètres physiologiques mesurés, dont l'hématocrite, le traitement à l'EpoRH s'est avéré sans risques. Trente jours après l'accident, les patients traités à l'EpoRH présentent des lésions cérébrales plus faibles à l'Imagerie par Résonance Magnétique et de meilleures scores neurologiques que les patients non traités<sup>60</sup>.

Chez les patients atteints de sclérose multiple, l'EpoRH a été administrée par voie intraveineuse à faible dose (8 000 U) ou à forte dose (48 000 U) ; une fois par semaine pendant les 12 premières semaines, puis 2 fois par semaine pour les 12 semaines suivantes. Seul le traitement à forte dose a amélioré les performances motrices des patients. En effet, la distance de marche a été augmentée et la conduction du message nerveux améliorée. Ces effets bénéfiques ont persisté entre 3 semaines et 6 mois après la dernière injection d'EpoRH<sup>59</sup>.

Chez les patients schizophrènes, le traitement hebdomadaire à de fortes doses d'EpoRH (40 000 U en intraveineuse) pendant 12 semaines augmente les performances cognitives des patients sans aggraver leur capacité motrice ni leur comportement en société. En outre, ce traitement diminue la concentration plasmatique de la protéine S100B, marqueur de souffrance cérébrale<sup>62</sup>.

En conclusion, les résultats de ces études cliniques sont remarquables puisqu'ils démontrent des effets neuroprotecteurs de l'EpoRH, initialement observés dans des études pré-cliniques chez l'animal. En outre, selon ses auteurs, les traitements à l'EpoRH sont sans risques et n'ont jamais nuit à l'état des patients.

## **PARTIE VI : COMMENT LE SYSTEME EPOERGIQUE PROTEGE T-IL LE SNC ?**

### ***VI-1 Blocage des mécanismes de Mort Cellulaire Active dans les neurones***

La fixation de l'Epo sur l'EpoR entraîne l'activation des Janus Kinases 2 (voir paragraphe IV.2.e), et déclenche des voies de signalisation intracellulaire qui contrecarrent les mécanismes de Mort Cellulaire Active (MCA). Ces voies protectrices agissent soit directement en bloquant l'activité des protéines pro-MCA, soit indirectement, en modifiant l'expression de certains gènes. Les voies de signalisation de l'EpoR, caractérisées en premier lieu dans les cellules hématopoïétiques, sont depuis quelques années étudiées dans les neurones. Diverses études ont démontré que les effets neuroprotecteurs du système Epoergique impliquaient principalement quatre voies de signalisation (voir figure 9).

#### **La voie PI3K/ Akt** (pour phosphoinositide-3-kinase/ protéine kinase B)

Dans plusieurs modèles de neurodégénérescence, le traitement à l'Epo augmente la phosphorylation de la protéine Akt, suggérant le recrutement de la voie PI3K/ Akt par l'activation de l'EpoR<sup>57,124,209,295</sup>. Le blocage de l'activité PI3K par les agents LY294002 et Wortmannin annihile les effets protecteurs de l'activation de l'EpoR dans des cultures de neurones<sup>26,38,55,61,206,217,226</sup>, des cultures de neuroblastomes humains (SH-SY5Y)<sup>256</sup>, et dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat<sup>295</sup>.

*Les effets cytoprotecteurs de la voie PI3K/ Akt, caractérisés dans d'autres types cellulaires, passent par le blocage de l'activité des facteurs de transcription FOXO (pour Forkhead transcription factors) et p53, tous deux impliqués dans la régulation de gènes pro-MCA<sup>25,154</sup>. La protéine Akt interagit également directement avec la protéine Bad, réduisant ses effets délétères sur la membrane mitochondriale<sup>25</sup>. Enfin, la voie PI3K/ Akt permet d'activer le facteur de transcription NFκB, également impliqué dans la survie cellulaire (voir figure 9).*

#### **Le facteur de transcription NFκB** (pour facteur nucléaire κ B)

Le rôle du NFκB dans les effets anti-MCA de l'Epo a été montré dans des cultures de neurones<sup>56</sup>. Le traitement à l'Epo engendre une augmentation d'une part de la phosphorylation de IκB et d'autre part de la translocation nucléaire du NFκB. En revanche, le blocage des Jak-2 par l'agent AG490 réduit fortement la concentration nucléaire du NFκB. Lorsque la dissociation de IκB et NFκB ou la translocation nucléaire de NFκB est bloquée, les neurones en culture soumis à une condition d'excitotoxicité ne

peuvent être sauvés par l'Epo<sup>56</sup>. En outre, l'inhibition de l'expression du gène NFκB dans des neurones en culture, par l'utilisation d'ARN interférant, engendre une diminution des effets neuroprotecteurs de l'Epo contre la toxicité du peptide β-amyloïde<sup>39</sup>.

*Les effets cytoprotecteurs de la voie NFκB sont attribués à l'activation de l'expression des protéines anti-MCA<sup>154</sup>, telles que les IAPs<sup>166,270</sup> et Bcl2/ Bcl-XL<sup>30</sup> (voir figure 9).*

#### **La voie MAPk** (pour protéine kinase à activité mitogène)

Les MAPk seraient impliquées dans la protection neuronale induite par l'Epo. C'est du moins ce que suggère une étude sur un modèle de neurodégénérescence de la rétine chez la souris. En effet, la neuroprotection par l'Epo est annihilée par le blocage de la voie des MAPk<sup>87</sup>. En outre, l'Epo augmente la phosphorylation de la protéine ERK dans des cultures de neurones<sup>226</sup> et de neuroblastomes<sup>256</sup>, et dans divers modèles *in vivo*<sup>124,209,295</sup>, suggérant l'implication de la voie des MAPk dans les effets neuroprotecteurs de l'Epo.

*Les effets cytoprotecteurs de la voie des MAPk sont attribués à l'activation de l'expression des protéines anti-MCA (voir figure 9).*

#### **Le facteur de transcription STAT-5** (pour transducteur du signal et activateur de la transcription)

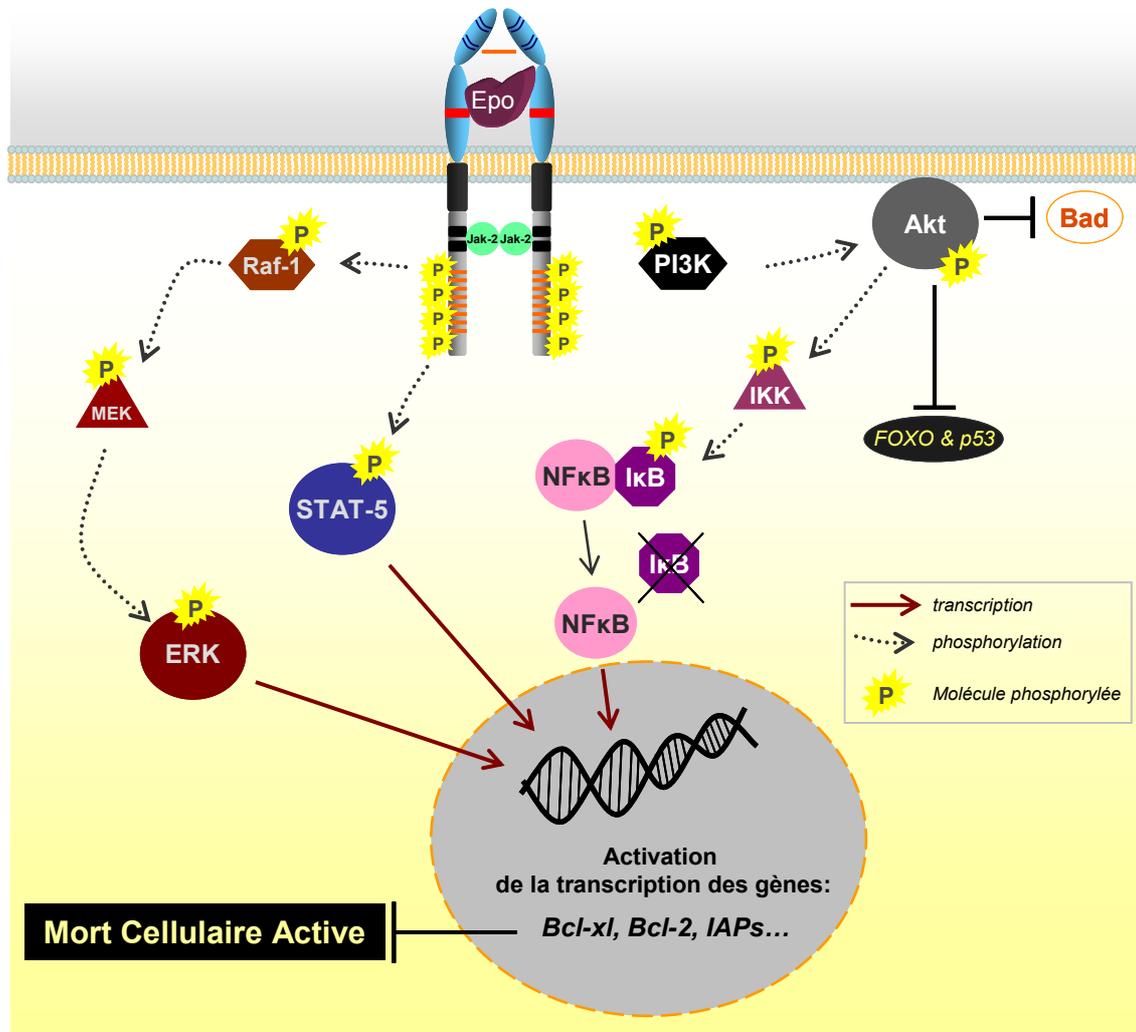
Plusieurs études *in vivo* montrent que les effets neuroprotecteurs de l'Epo exogène sont associés à une augmentation de la concentration cérébrale i) de STAT-5 chez le jeune raton (P7)<sup>233</sup> et ii) de STAT-5 phosphorylé chez le rat adulte<sup>296</sup>. A ce jour, une seule étude a démontré l'implication directe de STAT-5 dans les effets protecteurs de l'Epo sur des lignées neuronales<sup>256</sup>. *In vitro*, l'activation de l'EpoR protège les neuroblastomes humains (SH-SY5Y) contre les effets pro-apoptotiques de la staurosporine ; ces effets sont associés à une augmentation de la concentration intracellulaire de STAT-5 phosphorylé. En revanche, lorsque la phosphorylation de STAT-5 est bloquée, l'activation de l'EpoR n'a plus d'effet anti-apoptotique<sup>256</sup>. Récemment, une étude réalisée sur des neurones hippocampiques de souris STAT-5<sup>-/-</sup> indique que STAT-5 serait impliquée dans la neurogenèse induite par l'Epo mais pas dans les effets neuroprotecteurs de l'Epo<sup>26</sup>. Ainsi, ces deux études contradictoires sèment le doute dans l'implication de STAT-5 dans

#### **Voies de signalisation de l'EpoR dans les neurones : place aux doutes !**

Les travaux sur l'identification des voies de signalisation empruntées par l'EpoR sont basés sur les connaissances obtenues dans les cellules hématopoïétiques. Plusieurs études, présentées précédemment, tendent à confirmer l'implication de ces voies dans la neuroprotection induite par l'activation de l'EpoR. Toutefois, d'autres résultats contredisent ces études. En effet, le blocage des voies des MAPk et PI3K/ Akt n'altère pas forcément les effets neuroprotecteurs de l'Epo<sup>87,209</sup> et les effets neuroprotecteurs de l'Epo ne sont pas associés à une augmentation i) du NFκB dans une étude chez le raton<sup>233</sup> et ii) de STAT-5 dans des cultures de neurones<sup>206</sup>. Récemment, une étude réalisée sur des neurones hippocampiques de souris KO-STAT-5 indique que STAT-5 serait impliquée dans la neurogenèse induite par l'Epo mais pas dans les effets neuroprotecteurs de l'Epo<sup>26</sup>. Ces résultats contradictoires sèment le doute dans l'implication de ces voies de signalisation dans la neuroprotection induite par l'Epo, et encouragent donc la recherche dans ce domaine.

les effets protecteurs de l'Epo.

Les effets cytoprotecteurs de la voie *STAT-5* seraient induits par l'activation de l'expression de gènes anti-MCA tels que ceux codant pour *Bcl-XL* et les *IAPs*<sup>166</sup> (voir figure 9).



**Figure 9: Voies de signalisation intracellulaire de l'EpoR.** La fixation de l'Epo sur son récepteur entraîne l'activation de plusieurs voies de signalisation qui contrecarrent les mécanismes de la MCA. Dans la voie des **MAPK**, la protéine kinase Raf-1 est la première à être phosphorylée ; elle-même active à son tour la protéine MEK qui phosphoryle spécifiquement les résidus sérines et thréonines de la protéine ERK. Une fois phosphorylée, ERK est transloquée dans le noyau, et active plusieurs facteurs de transcription. La protéine **STAT-5** se compose d'un domaine de liaison à l'ADN, d'un domaine SH2 et de résidus tyrosines. Lorsque STAT-5 lie par son domaine SH2 une phosphotyrosine de la partie intracytoplasmique de l'EpoR, Jak-2 phosphoryle STAT-5 au niveau d'une de ses tyrosines. STAT-5 phosphorylé se dissocie alors de l'EpoR et forme un hétérodimère. Sous cette conformation, STAT-5 est transloqué dans le noyau et initie la transcription de gènes. La protéine **PI3K** est phosphorylée une fois que l'EpoR est activé. La PI3K phosphoryle à son tour la phosphatidylinositol-4,5 biphosphate en phospho inositide-3,4,5 triphosphate (PI(3,4,5)P3). Le PI(3,4,5)P3 fixe avec une très grande affinité Akt, provoquant sa phosphorylation. Une fois activée, Akt se détache de la membrane plasmique, migre dans le cytosol où elle interagit avec de nombreuses autres protéines (Bad, FOXO, p53) et subit une translocation dans le noyau où elle active des facteurs de transcription. Akt est aussi responsable de l'activation de la voie **NFκB**. C'est un facteur de transcription inactivé par une protéine inhibitrice IκB. La phosphorylation de IκB par l'activation de la protéine IK kinase (IKK) entraîne son ubiquitinylation et sa dégradation par les protéasomes. NFκB libéré migre dans le noyau et active la transcription de gènes cibles.

## **VI.2 Modulation de la neuroinflammation**

Comme nous l'avons vu précédemment (voir chapitre III), l'inflammation cérébrale peut exacerber la dégénérescence neuronale dans divers modèles d'agressions du SNC. Or, plusieurs études montrent que les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH sont associés à une réduction de la réponse inflammatoire cérébrale. En effet, dans des modèles d'inflammation de la moelle épinière<sup>4,210</sup>, ou d'accident cérébral<sup>31,243,264,289</sup>, le traitement à l'EpoRH réduit: i) l'activation des cellules microgliales et des astrocytes<sup>4,264,289</sup>, et ii) l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  ou MCP-1<sup>4,210,243,264</sup>. En outre, dans le cadre du SE, les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH dans l'hippocampe sont associés à une réduction de l'activation gliale<sup>40</sup>.

Au regard de ces résultats, deux questions se posent:

- Est-ce la protection neuronale engendrée par l'EpoRH qui provoque une moindre réponse inflammatoire ? En effet, si l'EpoRH protège les neurones, l'activation des cellules impliquées dans la phagocytose (microglie/ macrophage) et la libération des cytokines pro-inflammatoires par ces cellules sont réduites.
- Est-ce que l'EpoRH module directement la neuroinflammation, en réduisant l'activation des cellules de l'immunité ? En effet, le fait que les astrocytes expriment l'EpoR à la suite d'une agression cérébrale<sup>176</sup>, suggère que l'Epo peut exercer un effet direct sur les astrocytes. En outre, des études *in vitro* ont montré que l'EpoRH protégeait les neurones en bloquant l'activation des cellules microgliales, prévenant ainsi leur activité de phagocytose<sup>38</sup>.

## **VI.3 Modulation du flux sanguin cérébral**

Par l'augmentation du flux sanguin cérébral, l'EpoRH favoriserait le métabolisme cellulaire et préviendrait ainsi la souffrance neuronale. L'EpoRH améliore le débit sanguin cérébral d'une part en exerçant un effet vasodilatateur et d'autre part en stimulant l'angiogenèse. En effet, le traitement à l'EpoRH dans un modèle d'hémorragie subarachnoïde diminue la vasoconstriction des artères<sup>83</sup> et favorise ainsi l'apport sanguin cérébral. En outre, plusieurs études montrent que l'EpoRH stimule l'angiogenèse<sup>109,143,271</sup>. Dans un modèle d'ischémie, le traitement à l'EpoRH stimule l'angiogenèse i) en protégeant les cellules endothéliales, ii) en augmentant la formation de nouvelles cellules endothéliales et iii) en augmentant l'expression de protéines pro-angiogéniques telles que le récepteur protéine kinase Tie-2, l'angiopoïétine et le VEGF (pour *Vascular Endothelial Growth Factor*) dans la zone de l'infarctus<sup>143</sup>. Dans cette étude, il est particulièrement intéressant de constater que l'augmentation de l'angiogenèse cérébrale chez les animaux traités à l'EpoRH est associée à une restauration du flux sanguin dans la région affectée.

#### **VI.4 Augmentation de la neurogenèse**

Au-delà de son rôle dans la protection des neurones lors d'une agression du SNC, l'EpoRH stimule la production de nouveaux neurones, ou neurogenèse. Ainsi, dans des modèles d'atteintes cérébrales, l'EpoRH augmente la neurogenèse dans les régions lésées par le traumatisme<sup>81,109,152,271</sup>. Dans ces études, l'augmentation de la neurogenèse est associée à une protection tissulaire et/ ou à une récupération des fonctions cognitives, suggérant que le processus de neurogenèse participerait à la régénération cellulaire et tissulaire et au recouvrement des fonctions cérébrales. Les preuves d'une stimulation de la neurogenèse par l'Epo exogène corroborent les résultats obtenus sur le rôle du système Epoergique endogène dans la migration, la prolifération et la différenciation des cellules souches neurales<sup>32,221</sup>.

#### **A retenir !**

##### *L'EpoRH exerce ses effets neuroprotecteurs en agissant directement sur le neurone...*

La fixation de l'Epo sur son récepteur EpoR active plusieurs voies de signalisation impliquées dans les processus de survie cellulaire. Les voies PI3K/ Akt, NFκB, MAPK et STAT-5 sont aujourd'hui celles qui font (presque) l'unanimité dans la communauté scientifique. Néanmoins, les résultats parfois contradictoires entre les études *in vitro* et *in vivo* montrent à quel point il est difficile de transposer chez l'animal les observations obtenues à partir de cultures cellulaires.

##### *...mais aussi en agissant sur le micro-environnement du neurone.*

En effet, plusieurs études principalement *in vivo* montrent que les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH sont associés à une inhibition de la réponse inflammatoire, une amélioration de l'apport sanguin cérébral et une augmentation de la neurogenèse. Ces effets sur la plasticité cérébrale créent un environnement favorable à la survie neuronale et à la régénération tissulaire.

## **PARTIE VII : LES DERIVES DE L'ÉPORH ET LES CIBLES**

### **ALTERNATIVES POTENTIELLES**

#### ***VII.1 Dangers associés au traitement à l'ÉpoRH***

L'ÉpoRH est un agent neuroprotecteur puissant qui ouvre des perspectives encourageantes dans le traitement des accidents et maladies neurologiques. Malheureusement, comme de nombreuses molécules thérapeutiques, l'ÉpoRH est susceptible de provoquer des effets secondaires néfastes. L'effet physiologique le plus connu de l'ÉpoRH est la stimulation de l'hématopoïèse. Le traitement à l'ÉpoRH augmente l'hématocrite (rapport entre le volume des globules rouges et le volume sanguin total) en favorisant la production d'érythrocytes. C'est pourquoi, le traitement à l'ÉpoRH est utilisé afin de traiter les anémies, notamment chez les patients victimes d'insuffisance rénale et chez les patients cancéreux rendus anémiques par le traitement chimiothérapique. Le 17 avril 2007, les sociétés Amgen et Janssen-ortho ont publié un rapport alarmant sur l'usage de l'ÉpoRH chez des patients anémiques. En effet, plusieurs études cliniques ont arrêté prématurément le traitement à l'ÉpoRH car il augmentait la mortalité et le risque de troubles cardio-vasculaires chez les patients anémiques. Dans ce contexte, les risques associés au traitement à l'ÉpoRH sont engendrés par des modifications durables des propriétés hémodynamiques du sang.

Eu égard de ce rapport, la communauté scientifique est en droit de s'interroger sur la pertinence d'étudier les effets neurologiques d'une molécule qui s'est avérée dangereuse dans un autre contexte. Néanmoins, selon Hannelore Ehrenreich, ces risques sont inexistantes dans le cadre de traitement à l'ÉpoRH de courte durée dès que i) les paramètres hématologiques des patients sont scrupuleusement surveillés et ii) les critères d'exclusion sont choisis avec précaution<sup>59,60,62</sup>. Les résultats des études cliniques (voir paragraphe IV.5.b) montrent en effet que les patients victimes d'accident/ maladie neurologique traités à l'ÉpoRH ne connaissent pas d'aggravation de leur pathologie, ni de problèmes cardiovasculaires. Ceci peut notamment s'expliquer par le fait que l'augmentation de l'hématocrite chez ces patients n'est pas maintenue assez longtemps pour entraîner des perturbations du système cardio-vasculaire.

Néanmoins, depuis quelques années, dans un souci de précaution, de nombreux efforts sont consacrés au développement de nouvelles molécules d'Epo qui conservent une activité neuroprotectrice tout en étant dépourvues d'activité hématopoïétique.

## **VII.2 Les dérivés non hématopoïétiques de l'EpoRH et leurs effets neuroprotecteurs**

### **VII.2.a Asialo-Epo**

L'asialo-Epo est une molécule obtenue après digestion enzymatique des acides sialiques de l'EpoRH. Sa demi-vie plasmatique étant très faible en comparaison à la protéine native, l'asialo-Epo n'a pas d'effet hématopoïétique<sup>67</sup>. En revanche, trois études ont montré que le traitement à l'asialo-Epo était neuroprotecteur dans des modèles d'ischémie cérébrale<sup>67,273</sup>, de compression de la moelle épinière et du nerf sciatique<sup>67</sup> et de sclérose multiple<sup>163</sup>. Les résultats démontrent en effet que l'asialo-Epo protège le SNC et permet une récupération des fonctions cognitives de manière identique à l'EpoRH. L'asialo-Epo se lie à l'homodimère [EpoR]<sub>2</sub> avec la même affinité que l'EpoRH<sup>67</sup>. Toutefois, dans un modèle de maladie de Parkinson, l'asialo-Epo s'est montré inefficace pour protéger les neurones et améliorer les performances cognitives et fonctionnelles<sup>80</sup>.

### **VII.2.b L'Epo carbamylée**

La carbamylation des lysines de l'EpoRH en homocitrulline modifie la conformation et la fonction de la molécule. L'EpoRH carbamylée (CEpo) est dépourvue d'effet hématopoïétique<sup>175</sup> puisque son injection à de fortes doses chez des rongeurs, ne modifie ni la concentration en hémoglobine dans le sang, ni l'hématocrite<sup>137,153</sup>. En revanche, plusieurs études récentes montrent que la CEpo possède des effets neuroprotecteurs comparables à l'EpoRH. A l'heure actuelle, les effets bénéfiques de la CEpo ont été observés dans des modèles *in vivo* d'ischémie cérébrale<sup>137,265,274</sup>, de sclérose multiple<sup>163</sup>, de compression du nerf sciatique et de la moelle épinière<sup>137</sup>, d'irradiation cérébrale<sup>66</sup>, de neuropathie diabétique<sup>137,211</sup> et d'encéphalite<sup>137</sup>. Le traitement à la CEpo exerce des effets anti-apoptotiques et anti-inflammatoires<sup>163,265,274</sup> et stimule la neurogenèse<sup>153</sup>. En outre, la protection tissulaire observée chez les animaux traités à la CEpo s'accompagne d'une amélioration des capacités d'apprentissage<sup>153</sup> et d'une récupération des fonctions (sensori) motrices<sup>66,137,265</sup>.

L'ensemble de ces résultats montre donc que la CEpo, qui ne possède pas d'activité hématopoïétique, exerce des effets neuroprotecteurs. La perte de son activité hématopoïétique s'expliquerait par son manque d'affinité pour l'homodimère [EpoR]<sub>2</sub>, comme il l'a été démontré sur des cellules de lignées neuronales UT-7<sup>137</sup>. Ce dernier résultat suggère que la CEpo exercerait son action neurobiologique en se fixant à un site de liaison alternatif présent dans le SNC.

### **VII.3 Identité du site de liaison de l'Epo dans le SNC : controverse ?**

La CEpo ne se fixe pas sur l'homodimère [EpoR]<sub>2</sub> mais exerce tout de même des effets neuroprotecteurs. Ce résultat implique qu'il existe un récepteur à l'Epo différent de [EpoR]<sub>2</sub>, responsable des effets de l'Epo dans le SNC. Il a été proposé que ce récepteur soit un hétérodimère constitué d'un monomère d'EpoR et du récepteur de la chaîne β-c commune (βc)<sup>22</sup>. La chaîne βc est associée aux récepteurs de l'IL-6, l'IL-3 et du GM-CSF (pour *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*). Cette théorie explicitée dans une revue de Nature Neurosciences<sup>22</sup> reste sujette à controverse, les arguments en « faveur » et les arguments en « défaveur » de cette théorie sont présentés ci-dessous :

#### **Arguments en « faveur » du complexe EpoR/ βc dans le SNC**

- Les traitements à l'EpoRH et à la CEpo protègent la moelle épinière chez les souris sauvages, mais pas chez les souris KO-βc, suggérant que la βc soit indispensable aux effets neuroprotecteurs de ces deux molécules<sup>23</sup>. En outre, le fait que les souris KO-βc ne présentent pas de problème d'hématopoïèse implique que le récepteur de l'Epo responsable de la production d'érythrocytes ne comprenne pas la βc.
- L'EpoR est lié avec la βc sur la membrane plasmique des cellules P19 (lignée de tétarocarcinome murin), ce qui montre que l'association entre ces 2 protéines est possible<sup>23</sup>.
- L'association entre l'EpoR et la βc est fonctionnelle comme en témoigne une étude sur des cellules Ba/F3 (lignée myéloïde/lymphoïde murine). En effet, les cellules Ba/F3 qui expriment l'EpoR, présentent une plus grande sensibilité à l'EpoRH lorsque le gène βc est transfecté dans ces cellules<sup>115</sup>.

#### **Arguments en « défaveur » du complexe EpoR/ βc dans le SNC**

- Les effets anti-apoptotiques de l'EpoRH passent par l'homodimère [EpoR]<sub>2</sub> dans deux lignées cellulaires de type neuronal, les cellules PC12 (phéochromocytome de rat) et SH-SY5Y (neuroblastomes humain)<sup>255</sup>. En effet, non seulement l'EpoRH ne protège pas les cellules dès lors que l'expression de l'EpoR est réprimée, mais en plus les cellules PC12 et SH-SY5Y n'expriment pas la βc, compromettant ainsi toute alliance de l'EpoR avec la βc<sup>255</sup>.
- Chez le rat adulte, l'EpoRH protège les neurones de l'hippocampe après un *Status Epilepticus* alors que l'expression de la βc dans les neurones de cette région cérébrale est particulièrement faible et que celle de l'EpoR est importante<sup>176</sup>.

A l'exception de la publication de 2004 sur la souris KO-βc<sup>23</sup>, aucune étude n'a permis de renforcer l'hypothèse selon laquelle les sites de liaisons de l'Epo dans le SNC seraient composés d'un monomère d'EpoR et d'un homodimère de βc. Aujourd'hui, une simple caractérisation de l'expression cérébrale de l'EpoR et de la βc permettrait de savoir si la βc est présente dans les neurones. Cette information est indispensable pour démontrer une quelconque implication de la βc dans la neuroprotection par l'Epo.

# Objectifs généraux de la thèse

Objectifs	Modèles	Méthodes/ Analyses
<p><b>1</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Déterminer si la <math>\beta c</math> peut faire partie du récepteur responsable des effets neurobiologiques de l'Epo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etude de l'expression de l'EpoR, de la <math>\beta c</math> et de l'Epo dans plusieurs structures cérébrales à différents âges chez le rat mâle.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analyse transcriptomique <i>par RT-PCR en temps réel.</i></li> <li>• Analyse protéomique <i>par immunohistochimie</i></li> <li>• Analyse comparée de l'ensemble des données</li> </ul>
<p><b>2</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rechercher des stimuli environnementaux capables d'augmenter l'expression cérébrale de l'EpoR.</li> <li>• Vérifier si l'augmentation de l'expression neuronale de l'EpoR améliore les effets neuroprotecteurs de l'Epo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etude de l'expression cérébrale de l'EpoR chez le rat mâle adulte à la suite d'une ou trois expositions hypoxiques modérées, ou d'un hébergement dans un milieu enrichi.</li> <li>• Etude des effets neuroprotecteurs de l'Epo dans un modèle de <i>Status epilepticus</i> induit par pilocarpine chez le rat adulte</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analyse transcriptomique <i>par RT-PCR en temps réel.</i></li> <li>• Analyse protéomique <i>par immunohistochimie.</i></li> <li>• Calcul des lésions cérébrales <i>par analyse histologique.</i></li> <li>• Invention de la cage Marlaui <i>visant à standardiser l'enrichissement du milieu de vie des rongeurs</i></li> </ul>
<p><b>3</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Rechercher les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels l'EpoRH protège les neurones.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Etude dans le modèle de <i>Status epilepticus</i> choisi, des effets de l'EpoRH dans un contexte de neuroprotection, sur l'activation des voies de signalisation cellulaire et sur la réponse inflammatoire précoce et différée.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Analyse transcriptomique des gènes pro/ anti-mort cellulaire <i>par RT-PCR en temps réel.</i></li> <li>• Analyse protéomique <i>par immunohistochimie</i></li> <li>• Analyse de l'activation inflammatoire cellulaire <i>par des études histologiques</i></li> </ul>

## Matériels & Méthodes

---



*Régénération*, de Frédérique Cohen-Adad.

## **PARTIE I : EXPERIMENTATIONS *IN VIVO***

### ***I.2 Animaux et conditions d'hébergements des animaux***

L'ensemble des expérimentations sur les animaux décrites ci-dessous a été réalisé en accord avec la réglementation européenne (décret 86/609) et la loi française (décret 87/848) régissant l'expérimentation animale. Tous les efforts ont été mis en œuvre pour diminuer la souffrance des animaux et réduire leur nombre au cours des expériences. En outre, les expérimentations ont été réalisées dans une animalerie agréée par la Direction des Services Vétérinaires (n° 69 266 0602).

#### **I.2.a Phase d'acclimatation aux conditions d'hébergement**

Les rats utilisés sont des mâles de la souche Sprague-Dawley, c'est-à-dire des rats albinos de lignée non consanguine, fournis par Harlan France®. Les rats mâles réceptionnés à l'animalerie (période lumineuse 6-18 h, température 21°C, hygrométrie contrôlée 45%) sont hébergés avec une mère nourricière dans des cages de type E (Bac Polycarbonate E transparent, 450x300x200 mm, Charles River®). A l'âge de 21 jours, les rats mâles sont sevrés et repartis aléatoirement soit dans une cage de type E, soit dans une cage de milieu enrichi (Marlau™). L'hébergement dans la cage de type E est appelé hébergement « standard » dans lequel 5 ou 6 animaux sont placés. Des croquettes (aliments pour rongeurs type 04, SAFE®) et de l'eau sont à disposition *ad libitum*. Durant leur séjour au sein de l'animalerie, les animaux sont manipulés et pesés régulièrement par les expérimentateurs afin non seulement de favoriser leur acclimatation au nouvel environnement, mais aussi de suivre leur croissance.

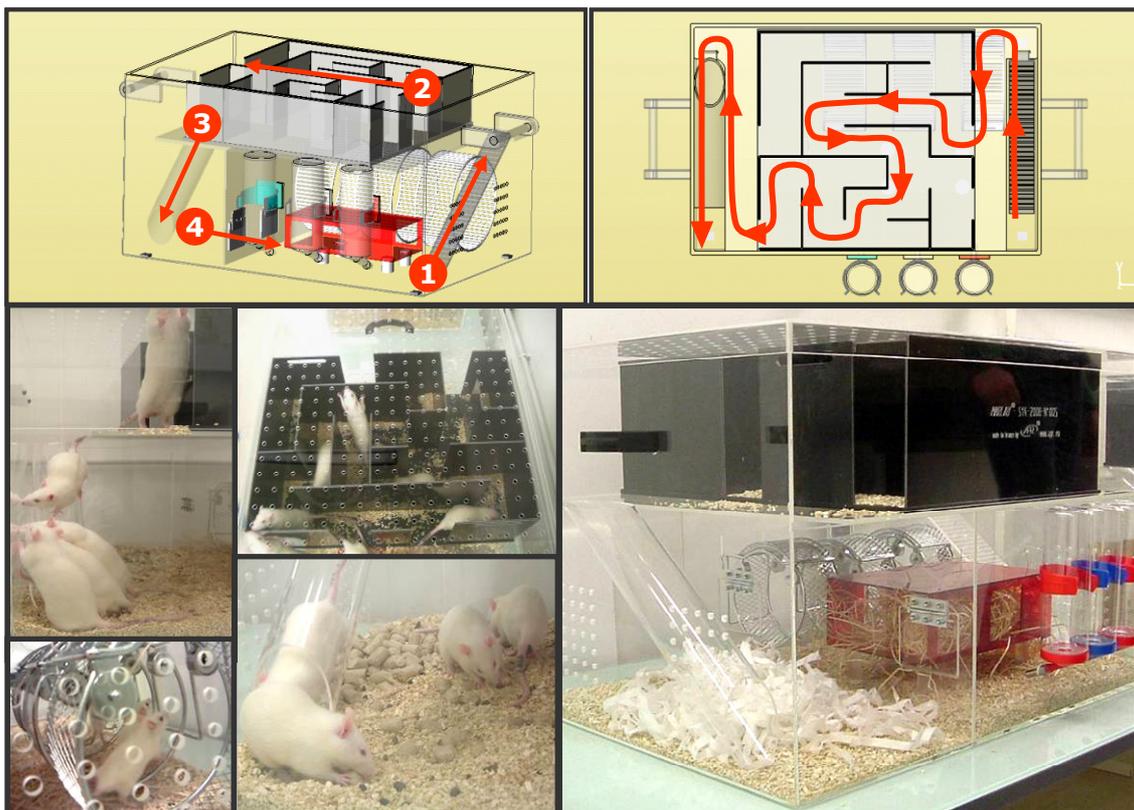
#### **I.2.b Présentation de la cage Marlau™ de milieu enrichi (Brevet FR09/00544)**

La cage Marlau™ inventée par Laurent Bezin, Raafat P. Fares, Marion Le-Cavorsin et Pascal E. Sanchez a fait l'objet d'un dépôt de marque. Cette cage est construite par la société APR (Saint Symphorien d'Ozon).

La cage Marlau™ a été inventée de telle sorte i) à augmenter les interactions sociales entre les animaux, ii) à favoriser les comportements spécifiques de l'espèce, iii) à stimuler les activités cognitives, et iv) à solliciter l'activité physique volontaire. La cage Marlau™ conçue sur 2 étages (80 cm de long x 60 cm de large x 51 cm de haut) peut accueillir 12 rats adultes. Elle est équipée de trois roues, un tunnel, 3 biberons, des mangeoires, un labyrinthe, un toboggan et une rampe. Pour accéder à la nourriture les rats doivent obligatoirement suivre l'itinéraire suivant (voir figure 10) : 1/ les rats montent par la rampe à l'étage supérieur, 2/ traversent le labyrinthe, 3/ glissent sur le toboggan jusqu'à la zone de nourriture. Ils peuvent ensuite retourner à la zone de boisson soit en prenant le chemin inverse, soit en empruntant 2 trappes à sens unique.

De plus, douze configurations de labyrinthe sont disponibles pour changer de configuration trois fois par semaine, le lundi, le mercredi et le vendredi. La surface de cage ramenée à un rat étant de 800 cm<sup>2</sup>, elle est ainsi 6 fois plus grande que celle de la cage standard. En outre, Marlau™ offre une surface d'exploration par animal 11 fois supérieure à celle d'une cage standard. L'eau et la nourriture sont fournies *ad libitum*.

Cette innovation a pour objectif de *standardiser l'enrichissement du milieu de vie chez les rongeurs*. Le fondement de cette standardisation réside dans l'obligation pour les animaux de suivre une trajectoire dans la cage, motivée par la recherche de nourriture. En effet, tous les animaux sont forcément exposés à l'élément principal de Marlau™ : le labyrinthe. Ce dernier représente une très forte stimulation cognitive basée sur la *complexité* des structures de chaque labyrinthe qui sollicite les capacités de mémorisation spatiale, et sur la *nouveauté* imposée par les trois changements de configuration hebdomadaires qui sollicitent les capacités d'exploration spatiale. En outre, cette procédure offre aux rongeurs l'opportunité d'interagir activement avec leur environnement.



**Figure 10:** La cage Marlau™ : illustration i) du trajet effectué pour atteindre la nourriture, et ii) des rats en activité.

## **I.2 Protocoles d'exposition à l'hypoxie**

L'hypoxie est réalisée dans une chambre hermétique transparente (Biospherix, USA). La teneur en oxygène dans la chambre est programmée à l'aide du système Pro-ox (Biospherix, USA), qui par l'intermédiaire d'un capteur d'oxygène, régule la proportion d'O<sub>2</sub> dans l'air par diffusion de diazote pur. Le Pro-ox est calibré à partir du point 0% d'O<sub>2</sub>, obtenu à la sortie de la bouteille d'azote pur, et à partir du point 20,9% correspondant à la proportion d'O<sub>2</sub> dans l'air ambiant. Pour que la répartition de l'azote soit homogène à l'intérieur de la chambre, un ventilateur fonctionne en permanence. De la chaux sodée et du sulfate de calcium (Drierite, Promega) sont disposés sur le fond de la chambre pour capter respectivement le CO<sub>2</sub> et l'H<sub>2</sub>O qui ont tendance à s'accumuler au cours de l'exposition hypoxique. Une fois les rats placés dans la chambre, 1 heure est nécessaire pour que la proportion d'O<sub>2</sub> dans la chambre descende progressivement jusqu'à 8%. L'hypoxie est maintenue 6 heures à 8% d'O<sub>2</sub> dans la chambre en condition normobare. Les animaux sont exposés à une seule exposition hypoxique ou à 3 expositions hypoxiques. Dans ce dernier cas, les séances d'hypoxie sont espacées de 4 jours afin de favoriser la récupération des rats.

## **I.3 Modèle d'induction du Status Epilepticus (SE)**

### **I.3.a Induction du SE : traitements pharmacologiques**

Les traitements pharmacologiques décrits ci-dessous ont été réalisés sur des rats mâles âgés de 7 à 10 semaines. L'état de mal cérébral, ou *Status Epilepticus (SE)*, est induit par l'injection intrapéritonéale de pilocarpine hydrochloride (P-6503, Sigma®), un agoniste cholinergique agissant sur les

Le **diazépam** (Valium®) appartient à la famille des benzodiazépines. Connu pour ses propriétés anxiolytiques et anti-convulsivantes il est encore quelquefois utilisé en clinique. Les benzodiazépines agissent comme modulateur allostérique positif des récepteurs de type GABA A, potentialisant ainsi la neurotransmission inhibitrice GABAergique.

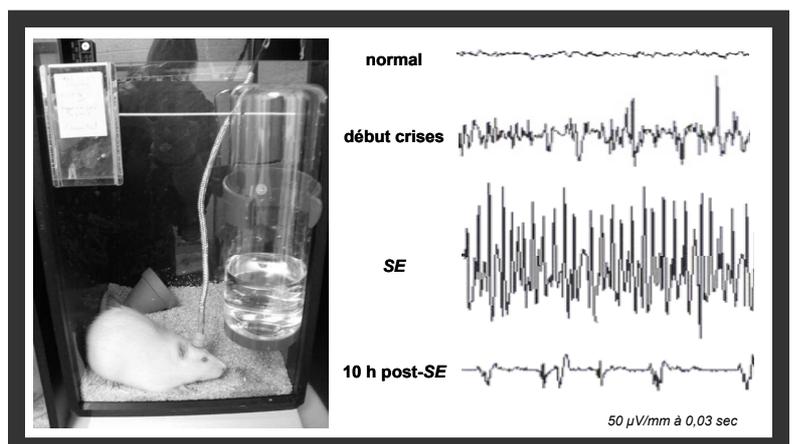
récepteurs muscariniques centraux et périphériques. La dose appropriée de pilocarpine est de 0,177 mg/cm<sup>2</sup>, sachant que la surface corporelle du rat est estimée selon la formule : *Surface corporelle = 200 + masse corporelle*. Afin de limiter les effets périphériques indésirables de la pilocarpine, les rats ont été traités préalablement (30 min) avec un antagoniste des récepteurs muscariniques, la scopolamine méthyl nitrate (0,5 mg/mL dans du NaCl 0,9% ; S-2250, Sigma®). La scopolamine et la pilocarpine sont dissoutes dans une solution de chlorure de sodium à 0,9%. Dès l'injection de pilocarpine, toujours effectuée entre 7 h et 9 h du matin, les observations des manifestations comportementales permettent de déterminer l'heure du déclenchement du SE. Le SE est stoppé après trois injections de diazépam (Valium®, Roche) 2 heures (10 mg/kg, ip), 2h30 (5 mg/kg, ip) et 5 h (5 mg/kg, ip) après son initiation.

### I.3.b Validation du modèle de SE par l'enregistrement électroencéphalographique

Nous avons enregistré l'électroencéphalogramme (EEG) d'une cohorte de rat pendant l'induction et l'arrêt du SE. Une semaine avant le SE, nous implantons les électrodes d'enregistrement en respectant le protocole suivant. Une fois anesthésiés avec un mélange de xylazine (10 mg/kg ; Bayer) et de kétamine (80 mg/kg ; Merial), les rats sont placés dans un cadre stéréotaxique. Une injection sous-cutanée de lidocaïne (100  $\mu$ L ; Ceva) est pratiquée avant l'incision du scalp. Après perforation de la boîte crânienne, trois vis sont implantées dans l'os du crâne de telle sorte à ce qu'elles soient en contact avec la dure-mère. Une fois le connecteur soudé sur les vis, du ciment dentaire fixe l'ensemble de la structure au crâne. Dès que les rats se réveillent de l'anesthésie, ils sont disposés individuellement dans les cages. Quelques heures après l'intervention chirurgicale, ils retrouvent une activité « normale » (alimentation, hydratation et toilettage).

Le jour de l'induction du SE, les rats sont disposés individuellement dans des cages à l'intérieur de la chambre de Faraday. Ils sont connectés par des tresses à un système central de traitement des signaux électriques (logiciel Deltamed). Il est ainsi possible de suivre leur activité EEG au cours des traitements pharmacologiques.

Les résultats de cette expérimentation, illustrés dans la figure 11, montrent qu'il est possible de corrélérer de manière fiable les manifestations comportementales des rats et la crise EEG. Ainsi, dans le cadre de nos études, nous pouvons considérer que l'observation des crises comportementales est un indicateur suffisant pour déterminer avec précision l'heure à laquelle le rat rentre en SE. En outre, cette étude a également permis de nous rendre compte qu'il était nécessaire d'augmenter les doses de diazépam (20 mg/ kg au total) afin de stopper plus efficacement la crise EEG. D'une manière générale, l'amplitude de l'EEG retrouve un niveau de base chez l'ensemble des animaux 6 heures après la dernière injection de diazépam.



**Figure 11: Enregistrement électroencéphalographique au cours de l'induction du SE.** Les tracés EEG illustrent l'entrée en SE quelques minutes après l'injection de pilocarpine. Pendant le SE, la crise EEG est continue. Puis, les injections de diazépam à la fin du SE réduisent l'activité EEG, comme illustré 10 heures post-SE.

### **I.3.c Soins apportés aux animaux après le SE**

Le *SE*, modèle de lésion cérébrale très sévère, provoque de fortes souffrances chez l'animal. L'expérimentateur dispose de plusieurs indicateurs de la souffrance endurée par le rat : position prostrée, arrêt du toilettage, agressivité, anxiété, poil hérissé et diminution de la masse corporelle. Tous les jours, les animaux sont observés, manipulés et pesés afin de déterminer leur état de souffrance. Généralement, les animaux ne s'alimentent et ne s'hydratent plus pendant 2-3 jours ; leur masse corporelle pouvant chuter d'environ 20%. Hypersensibles, ils sont très difficiles à manipuler et demandent une attention particulière des expérimentateurs. Les animaux sont agressifs et doivent donc être manipulés avec précaution. Ils sont réhydratés avec du sérum physiologique (sous-cutanée) ou avec de l'eau (directement dans la bouche) et avec des tranches de pomme tant qu'ils ne sont pas capables de s'alimenter avec les croquettes. Les rats vont généralement beaucoup mieux (toilettage, alimentation, re-hydratation...) 4 ou 5 jours après l'induction du *SE*.

### ***I.4 Protocole d'administration de l'EpoRH***

Les animaux qui ont bénéficié du traitement à l'EpoRH (Eprex®, Janssen-Cilag) ont reçu 3 injections à raison de 5000 U/kg par voie ip 2h, 24h et 72h après le début du *SE*. A chaque jour d'injection, une solution d'EpoRH (Eprex®, Janssen-Cilag, France) à 2,5 UI/mL a été préparée à partir d'une solution mère (40 000 UI/mL ; i.e. 336 µg/mL) diluée dans du sérum physiologique. Chez les rats témoins, les injections d'EpoRH ont été remplacées par l'administration de sérum physiologique (NaCl à 0,9%). L'Eprex® a été généreusement offert par le laboratoire Janssen-Cilag (France).

## **PARTIE II : EXPERIMENTATIONS *EX VIVO***

### ***II.1 Procédures pour la préparation du tissu cérébral***

#### **II.1.a Prélèvement et traitements des tissus frais**

##### ***II.1.a.a Prélèvement des cerveaux et microdissections des structures cérébrales***

Les rats sont anesthésiés avec une dose létale de pentobarbital sodique (250 mg/kg en i.p.; CEVA) avant d'être décapités. Les cerveaux extraits de la boîte crânienne sont placés sur un plan de travail réfrigéré. La méthode de dissection des structures cérébrales d'intérêt est expliquée dans la figure 12. Les tissus cérébraux sont immédiatement congelés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL plongés dans l'azote liquide. Toutes ces procédures sont réalisées rapidement afin de préserver les ARN totaux et les protéines des enzymes de dégradation. Les échantillons sont conservés dans un congélateur à -80°C jusqu'à utilisation.

##### ***II.1.a.b Traitements des échantillons tissulaires et préparation des ARN totaux***

###### ***II.1.a.b.a Extraction des ARN totaux et purification***

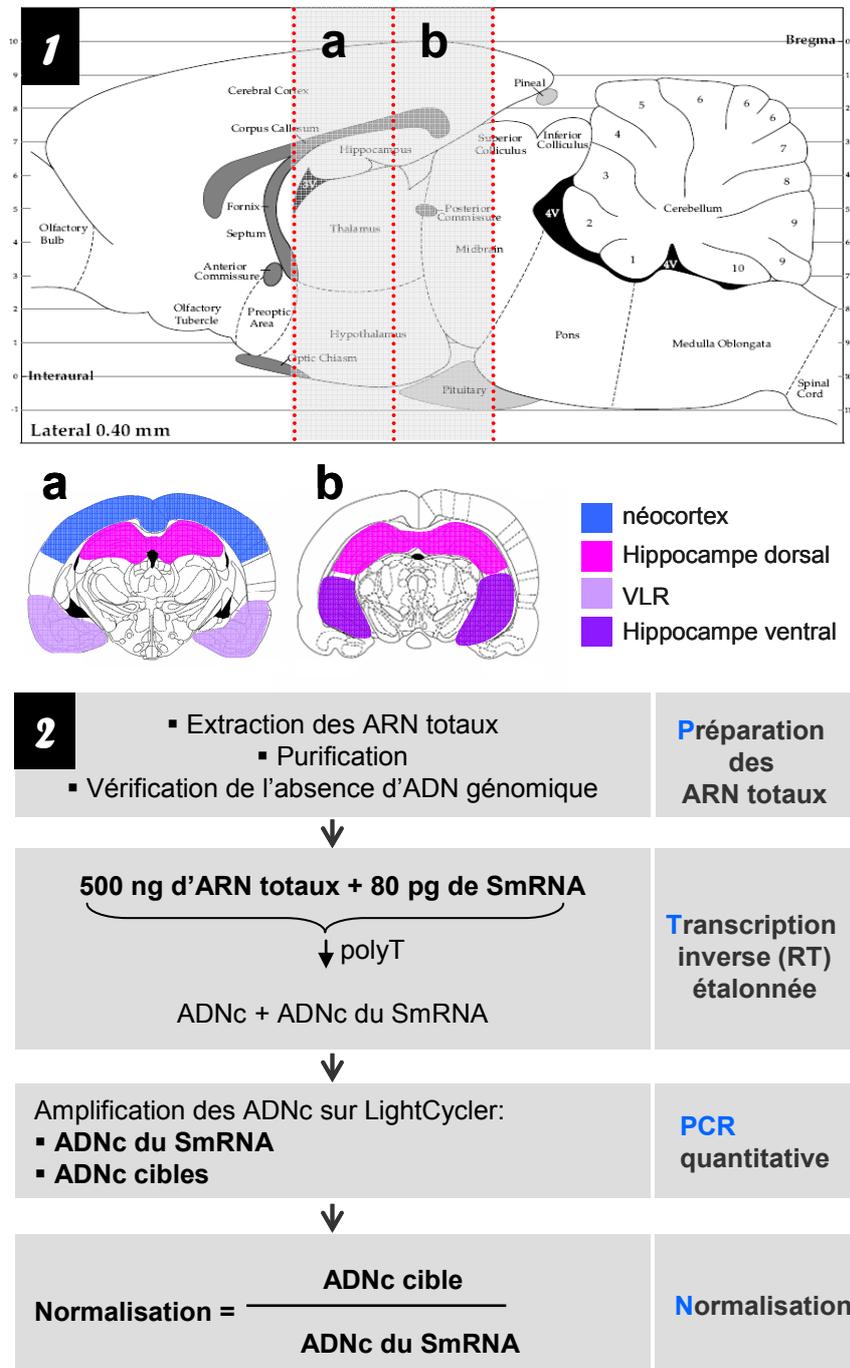
Les structures cérébrales congelées sont broyées à l'aide de pistons dépourvus de RNases, avant d'être homogénéisées dans 280 µL d'eau ultra-pure (UP) (Eurobio) à l'issue de 3 cycles de congélation/ décongélation. Un volume de 30 µL d'homogénat est prélevé pour les dosages protéiques. Les acides nucléiques sont extraits par l'ajout de 750 µL de Tri-Reagent LS (Euromedex) dans les 250 µL d'homogénat

###### **Attention ! ARN fragiles !**

Les ribonucléotides étant des molécules fragiles, l'extraction des ARN totaux nécessite quelques précautions :

- Les tissus sont manipulés dans un environnement *dépourvu de RNases*, avec des gants et des outils également *exempts de RNases*.
- Le *travail au froid* réduit l'activité des RNases.
- L'extraction au *phénol* (contenu dans le Tri-Reagent LS) est réalisée en présence d'isothiocyanate de guanadinium qui permet d'inhiber l'activité des RNases.

restant. Puis, l'addition de 200 µL de chloroforme suivie d'une centrifugation (15 min à 4°C; 12000 x g) isole les acides nucléiques. Ceux-ci, situés dans la phase supérieure aqueuse, sont récupérés puis traités avec 500 µL d'isopropanol (Sigma). Après centrifugation (10 min à 4°C; 12 000 g), le surnageant est éliminé et le culot d'acides nucléiques est lavé dans 1,5 mL d'éthanol à 75%. Après centrifugation (10 min à 4°C ; 12 000 g) et élimination de l'éthanol, les culots sont séchés à 37°C puis repris dans 200 µL d'eau UP. Une fois mélangés au vortex à vitesse lente, les échantillons sont congelés à -80°C jusqu'à utilisation.



**Figure 12: Dissection des structures cérébrales d'intérêt et RT-PCR en temps réel. (1)** Deux tranches coronales d'une épaisseur d'environ 2mm sont découpées dans la région de l'hippocampe. Le néocortex, les parties dorsale (a) et ventrale (b) de l'hippocampe et la région ventrale limbique (VLR) sont prélevés et stockés à -80°C. De plus, dans la majorité des protocoles expérimentaux, les structures cérébrales du côté gauche sont réservées pour le dosage des transcrits, et celles du côté droit pour le dosage des protéines. **(2)** Ce schéma illustre les différentes étapes de la RT-PCR en temps réel, expliquées dans les paragraphes de la partie Méthodes.

Les ARN totaux extraits sont purifiés par le traitement à la Turbo DNA Free (Ambion) durant 30 min à 37°C. La Turbo DNA Free contient de la DNase recombinante qui élimine toute trace éventuelle d'ADN génomique (ADNg). A l'issue de la purification, la concentration en ARN totaux est déterminée par la mesure spectrophotométrique de la densité optique (DO) sur un Biophotomètre (Eppendorf). La solution contenant les ARN totaux est déposée dans une UVette exempte de RNAses (Eppendorf) qui est excitée par une longueur d'onde de 260 nm par le Biophotomètre (une unité de DO est équivalente à 40 µg/mL d'ARN).

#### **II.1.a.b.b Vérification de la qualité des ARN totaux**

Afin de valider le protocole d'extraction des ARN totaux, l'équipe a vérifié il y a quelques années, la qualité des ARN totaux à l'aide d'un bioanalyseur (2100 bioanalyser, Agilent) par électrophorèse sur une puce d'analyse (Nano LabChip #5065-4476, Agilent). Les résultats ayant été satisfaisants à l'époque, nous ne réalisons plus cette étape systématiquement après l'extraction.

#### **II.1.a.b.c Vérification de l'absence de contamination en ADN génomique**

L'absence de contamination en ADN génomique est vérifiée sur 25 ng d'ARN totaux de l'échantillon purifié, par l'amplification par PCR en temps réel d'une séquence de l'exon V du gène codant pour le BDNF (pour *Brain-Derived Neurotrophic Factor*). Le volume réactionnel contenu dans les capillaires comprenait 5 µL de solution concentrée à 5 ng/µL d'ARN totaux, et 5 µL de mélange réactionnel réalisé à partir du kit Roche d'amplification. Ce mélange comprenait 2,75 µL d'eau UP, 1 µL de « Hot Start reaction mix » (Roche), 1 µL de solution MgCl<sub>2</sub> (3,5 mM final), et 0,25 µL d'amorces spécifiques à la concentration de 10 µM chacune. Les séquences d'amorces spécifiques utilisées et les conditions d'amplification sont précisées dans les tableaux 7 et 8, respectivement. Afin de vérifier le bon déroulement de la réaction de PCR, un standard de l'amplicon de l'exon V du gène *bdnf*, de concentration connue, est également amplifié. Si aucune amplification n'est observée, cela signifie que les traces éventuelles d'ADN génomique ont bien été éliminées pendant l'étape de purification. La solution d'ARN totaux purifiée peut alors servir à la transcription inverse (RT) des ARN messagers.

ADNc amplifié	Amorces	Taille de l'amplicon (pb)	Référence Genbank	kit amplification
<b>Bad</b>	sens 5' GGT CTC CTG GGG AGC ATC 3'	89	AF031227.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' CTC CGG GTC TCC ATA GTC 3'			
<b>Bcl-2</b>	sens 5' GTC TCT GAA GAC GCT GCT CA 3'	63	U34964.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' AGG TAT GCA CCC AGA GTG ATG 3'			
<b>Bcl-xl</b>	sens 5' TGA CCA CCT AGA GCC TTG GA 3'	220	U34963.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' CTC GGG TGC TGT ATT GTT CC 3'			
<b>Bcl-xs</b>	sens 5' TGA ACA GGA CAG TTT TGT GGA 3'	72	AF136230.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' AAA CGC TCC TGG CCT TTC 3'			
<b>Bid</b>	sens 5' GCC TGC GTC ATG GAC TCT 3'	90	AF259503.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' GTT TCG GAG AAA GCC GAA C 3'			
<b>BDNF exon V</b>	sens 5' AAA TTA CCT GGA TGC CGC AA 3'	345	X67108	<i>Roche</i>
	antisens 5' CGCCAG CCA ATT CTC TTT TT 3'			
<b>βc</b>	sens 5' CCT GGT GGC TCT CTG CTG 3'	68	NM_133555.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' GCA GAG TCT TCA GAG GGA CAG T 3'			
<b>Epo</b>	sens 5' GCT CCA ATC TTT GTG GCA TC 3'	66	NM_017001	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' ATC CAT GTC TTG CCC CCT A 3			
<b>EpoR</b>	sens 5' CCA GCT CTA AGC TCC TGT GC 3'	68	D13566	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' CTT CAG GTG AGG TGG AGT GG 3'			
<b>IAP-1</b>	sens 5' CCC AGA GGA TGA GAC TGG AG 3'	71	NM_001008292.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' TCA CTG CAT CTT CCC AAT TCT 3'			
<b>IAP-2</b>	sens 5' GAA AAT GCT GAC CCT CCA GT 3'	64	AF183431.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' TCA TCA CTG CAT CTT CCC AAT 3'			
<b>IAP-3</b>	sens 5' GCT TGC AAG AGC TGG ATT TT 3'	88	AF183429.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' TGG CTT CCA ATC CGT GAG 3'			
<b>IGF-1</b>	sens 5' ATG CCC AAG ACT CAG AAG GA 3'	110	NM_178866.2	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' CGT GGC ATT TTC TGT TTC TC 3'			
<b>IL-1β</b>	sens 5' GCA CCT TCT TTT CCT TCA TCT 3'	374	M98820.1	<i>Roche</i>
	antisens 5' CCG CTT TTC CAT CTT CTT CTT 3'			
<b>IL-6</b>	sens 5' TAC CAC CCA CAA CAG ACC A 3'	243	NM_012589.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' TCC AGA AGA CCA GAG CAG A 3'			
<b>MCP-1</b>	sens 5' CGG CTG GAG AAC TAC AAG AGA 3'	78	M57441.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' TCT CTT GAG CTT GGT GAC AAA TA 3'			
<b>MIP-1α</b>	sens 5' TCC ACG AAA ATT CAT TGC TG 3'	92	U06435.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' AGA TCT GCC GGT TTC TCT TG 3'			
<b>MIP-1β</b>	sens 5' CTC TGC GTG TCT GCC TTC T 3'	89	U06434.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' GTG GGA GGG TCA GAG CCT AT 3'			
<b>TNF-α</b>	sens 5' CAA ACC ACC AAG CAG AGG AG 3'	175	X66539.1	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' GTG AGG AGC ACA TAG TCG GG 3'			
<b>Tpo</b>	sens 5' CCC AAG CAG AAC CTC TCA AC 3'	200	D32207	<i>Qiagen</i>
	antisens 5' TCA GGT ATC CAG GGA TTT GG 3'			
<b>TpoR</b>	5' AGA ACC CAC AGA GTG GTG TG 3'	220	DQ013343	<i>Qiagen</i>
	5' TCA CAC CAT CCA GGA GCA AGA AT 3'			

**Tableau 7 : Séquences des couples d'amorces nucléotidiques sens et anti-sens utilisés pour l'amplification des ADNc cibles par PCR en temps réel.**

Les séquences des différents couples d'amorces sens et anti-sens ont été sélectionnées à l'aide du logiciel en ligne « primer 3 » ([NIHhttp://www.basic.nwe.edu](http://www.basic.nwe.edu)) en cherchant à minimiser:

- les complémentarités internes des séquences pour limiter la formation de structure en épingle à cheveux
- la complémentarité intrinsèque à l'extrémité 3'OH des amorces pour éviter une « auto-dimérisation »
- la complémentarité entre les amorces pour éviter la formation de dimères d'amorces

## **II.1.a Préparation des tissus fixés**

### ***II.2.a.a Fixation des tissus et prélèvement des cerveaux***

Les rats sont anesthésiés par l'injection d'une dose létale de pentobarbital sodique (250 mg/kg en i.p. ; CEVA), puis perfusés par voie intracardiaque, à raison de : 15 mL/min chez les P5 et 30 mL/min pour les autres âges (pompe Masterflex). La perfusion du cerveau par voie intracardiaque consiste en une incision réalisée au niveau de l'oreillette droite du cœur, de l'insertion de la canule de perfusion dans l'aorte au niveau du ventricule gauche et du clampage de l'artère abdominale. Les cerveaux sont dans un premier temps « rincés » 2 min avec un tampon phosphate salin (PBS ; pH 7,4 et température 4°C) à 0,1 M, puis fixés durant 8 min, à l'aide d'une solution de paraformaldéhyde (PF) à 4% préparée dans un tampon phosphate (PB ; pH = 7,4 et température à 4°C) à 0,1 M final. Après décapitation, les cerveaux sont délicatement retirés de la boîte crânienne, post-fixés dans une solution de PF à 4% durant 2 heures et déshydratés durant 48 heures dans une solution de saccharose saturée à 25%, préparée dans du PB à 0,1 M final pour préserver le tissu lors de la congélation. Les cerveaux sont ensuite congelés dans de l'isopentane à -40°C pendant 1 minute et 10 sec, et placés quelques min sur de la carboglace avant d'être stockés à -80°C.

### ***II.2.a.b Coupe des cerveaux perfusés***

Des coupes coronales de cerveaux d'une épaisseur de 40 µm sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Leica CM1850) maintenu à -20°C. Les coupes effectuées au niveau de l'hippocampe sont récupérées (coordonnée interaurale (IA) +6,70 mm à +3,80) dans des boîtes de 24 puits (Falcon), chaque puit contenant 1 mL de PBS 0,1 M. Tous les 240 µm, une coupe a été prélevée et montée sur lame gélatinée (1% de gélatine) pour une coloration au crésyl-violet qui permet non seulement de vérifier la qualité du tissu perfusé mais également de repérer les structures anatomiques. Les coupes restantes sont transférées dans une solution incongelable contenant 30% de glycérol 98% (Prolabo), 30% d'éthylène glycol (Prolabo) et 10% de tampon F (solution de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 217 nM et de NaOH à 192 nM). Les boîtes de 24 puits sont stockées à -20°C.

## **II.3 Dosage des ARN messagers par transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne en temps réel**

### **II.3.a La réaction de transcription inverse (RT)**

#### **II.3.a.a Calibration de la RT**

La méthode de calibration de la réaction de transcription inverse (RT) utilisée dans ces études a fait l'objet d'un dépôt de brevet (Brevet International n°WO2004.092414 enregistré le 17 avril 2004 déposé aux noms du CNRS et de l'UCB Lyon 1 par les co-inventeurs Laurent Bezin et Anne Morales). Cette calibration est basée sur l'ajout d'une quantité connue d'un ARN de synthèse possédant une queue polyA (SmRNA) dans le volume réactionnel final de chaque échantillon où s'opère la RT. Cet ARN de synthèse joue le rôle de *calibrateur externe hétérologue non compétitif* car :

- il possède une séquence nucléotidique distincte de toutes celles référencées dans les banques de données, tout génome confondu.
- la RT de cet ARN de synthèse n'interfère pas avec celle des ARNm endogènes aussi bien chez l'humain, la souris, le rat, le nématode, le gamare, l'arabidopsis thaliana et la drosophile.

Ainsi, cette méthode de calibration nous donne accès de façon fiable au rendement de la RT par le SmRNA dans chacun des tubes. Ce rendement est par la suite utilisé pour normaliser l'ensemble des réactions de RT réalisées dans chacun des tubes.

#### **II.3.a.b Calibration de la RT**

Afin de cibler exclusivement les ARNm contenus dans la solution d'ARN totaux (seulement un faible pourcentage), une amorce oligonucléotidique polyT<sub>15</sub> est utilisée pendant la réaction de RT. Cette réaction se réalise sur un volume réactionnel de 20 µL, contenant 12 µL de solution d'ARN totaux purifiés ramenée à 41,7 ng/µL (soit 500 ng d'ARN totaux), et 8 µL d'un mélange réactionnel

##### **A quoi ça sert ?**

- *Amorces polyT<sub>15</sub>*: Elles fixent la queue poly-A caractéristique des ARNm, présente à l'extrémité 3'. Elles permettent donc de reconnaître les ARNm avant l'étape de transcription inverse.
- *M-MLV Reverse Transcriptase* : l'enzyme transcriptase inverse permet de transcrire à l'envers, c'est-à-dire d'obtenir de l'ADN à partir de l'ARN.
- *Un dNTP* : est l'un des 4 désoxyribonucléotide où « N » peut être l'Adénine, la Cytosine, la Guanine et la Thymine. Dans la réaction de RT, ils sont indispensables pour la construction de l'ADNc.

comprenant: 100 U/µL de M-MLV Reverse Transcriptase RNase H minus (Promega), le tampon de l'enzyme, 0,5 mM de chacun des dNTPs (Promega), 1 µg d'amorces polyT<sub>15</sub> et 80 pg de SmRNA. Les tubes et les pointes utilisés sont à faible pouvoir de rétention (gamme *Maximum Recovery* de chez Axygen). Les RT de tous les échantillons correspondant à une même structure cérébrale ont été effectuées en même temps à partir d'un mélange réactionnel identique. Après une incubation de 90 min à 42°C, la transcriptase inverse est inactivée par la chaleur (15 min à 70°C). Puis, les solutions

d'ADN complémentaires (ADNc) obtenues pour chaque échantillon sont diluées dans 80  $\mu$ L d'eau UP. Les échantillons sont ensuite fractionnés en aliquotes de 5  $\mu$ L dans des tubes à faible rétention (Axygen) et stockées à -25°C.

### **II.3.b Amplification quantitative des ADNc d'intérêt par PCR en temps réel**

#### **II.3.b.a. Choix des amorces**

Les séquences des couples d'amorces sens et anti-sens spécifiques sont construites à l'aide du logiciel "Primer 3" (NIH; [www.basic.nwu.edu](http://www.basic.nwu.edu)) ou à l'aide du logiciel de la *Universal Probe Library* (Roche Diagnostics). Les amorces sont ensuite synthétisées par Eurogentec (voir tableau 7).

#### **II.3.b.b. Principe de la réaction de PCR en temps réel**

Les ADNc d'intérêt sont amplifiés par la technique de PCR en "temps réel" dans un thermocycleur Lightcycler™ (Roche). Ce thermocycleur permet la réalisation d'une réaction de PCR rapide, très sensible et hautement reproductible. En effet, la technologie à air pulsé du Lightcycler™ permet à l'ensemble des échantillons d'être exposés aux mêmes conditions thermiques. De plus, l'homogénéité des variations de température sur l'ensemble du volume réactionnel est assurée par l'utilisation d'un capillaire en verre de borosilicate résistant aux températures élevées. Un cycle de PCR comprend :

- une étape de dénaturation à 95°C des ADN double brin en ADN mono brin.
- une étape d'hybridation à 58-60°C des amorces spécifiques de la séquence cible à amplifier.
- une étape d'élongation à 72°C de l'ADN par la Taq polymérase, résistante aux températures élevées.

Pour le suivi de l'accumulation de l'ADNc amplifié cycle par cycle, un agent intercalant, le SYBR Green I ( $\lambda_{\text{excitation}} = 494 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{émission}} = 521 \text{ nm}$ ), est présent dans le milieu réactionnel. Le SYBR Green I n'émet une fluorescence que lorsqu'il est intercalé dans le petit sillon du double brin de l'ADN. Après chaque étape d'élongation, la lecture fluorimétrique permet de corrélérer la fluorescence mesurée à la quantité d'ADN double brin accumulée dans le milieu réactionnel. Le logiciel du Lightcycler permet l'analyse de la réaction de PCR dans sa phase exponentielle par la méthode du *maximum de la dérivée seconde*. Ainsi, cette méthode donne pour chaque échantillon *le point de sortie* (parfois appelé à tort *Ct*, pour *crossing threshold*), exprimé en *cycles de PCR*, dont la valeur est inversement proportionnelle à la concentration initiale d'ADNc de l'échantillon. Ce *point de sortie* est ensuite utilisé pour comparer la quantité d'ADNc contenue dans le milieu réactionnel de chacun des échantillons à l'issue de la RT. Une gamme d'étalonnage réalisée pour chaque ADNc cible permet d'établir une correspondance entre le PS et la quantité d'ADNc contenue dans le milieu réactionnel avant l'étape d'amplification.

### **II.3.b.c. Réalisation de la gamme étalon**

Afin d'étalonner la réaction d'amplification, une gamme étalon est réalisée pour chaque ADNc cible, sur plusieurs points de dilution d'un échantillon de départ concentré, allant de 1 copie à  $10^8$  copies. Pour chaque ADNc cible, la droite de régression linéaire établie entre le point de sortie et le nombre de copies des points de la gamme au début de l'amplification permet d'extrapoler, pour chaque échantillon à doser, à partir du point de sortie, le nombre de copies de l'ADNc contenu dans le produit de RT avant l'amplification.

Pour un gène donné, la gamme étalon est réalisée à partir d'une solution purifiée et de concentration connue de l'ADNc cible, appelé aussi *standard pur*. Cette solution est ensuite diluée en cascade au  $10^{\text{ème}}$ , dans de l'eau UP, afin d'obtenir différents points de concentration de la gamme (entre 10 et  $10^8$  copies). Chaque point de dilution, appelé *standard dilué*, est choisi de façon à ce que l'ensemble des points de la gamme encadre le PS des échantillons à doser. Après dosage du *standard pur*, la concentration en ng/ $\mu\text{L}$  est convertie en nombre de copies/ $\mu\text{L}$  à partir de la masse molaire et du nombre d'Avogadro. L'équation de la droite étalon, obtenue à partir de l'amplification des ADNc spécifiques contenus dans chaque point de gamme, permet i) de mettre en relation le PS d'un échantillon donné avec le nombre de copies d'ADNc présent dans celui-ci avant la réaction de PCR et ii) de calculer le coefficient d'efficacité de la réaction de PCR (compris communément entre 1,8 et 2) à partir de son coefficient directeur. L'équation de la droite étalon est la suivante :

$$\text{Point de sortie} = \text{coefficient directeur} \times \text{nombre de copies} + \text{ordonnée à l'origine}$$

$$\text{Efficacité de PCR} = 10^{-1/-(\text{coefficient directeur})}$$

La préparation du *standard pur* est réalisée sur un thermocycleur conventionnel (PCR Express ; Hybaid) à l'aide du couple d'amorces identique à celui utilisé sur Lightcycler™ et de deux types d'ADN polymérase : la HotStar Taq polymérase (HST) (Qiagen) qui amplifie l'ADNc cible et la Proof Star DNA polymérase (Qiagen) qui corrige, grâce à son activité 3' exonucléasique, les erreurs de réplication produites par la HST, afin d'obtenir un *standard pur* pour lequel les erreurs de réplication sont minimisées. Le milieu réactionnel contenait alors 300  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 0,5  $\mu\text{M}$  de chacune des amorces spécifiques du gène d'intérêt, 2  $\mu\text{L}$  d'ADNc obtenus après RT d'ARNm extraits à partir de tissu cérébral et enfin 5 U de HST. Après une incubation de 13 min à 95°C, la Proof Star DNA polymérase (0,05 U) est ajoutée, suivie d'une nouvelle incubation à 95°C durant 2 min. L'ADNc cible a alors été amplifié durant 30 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94°C durant 10 sec, une étape d'hybridation de 60°C durant 60 sec et enfin, une étape d'élongation à 68°C durant 25 sec. Après l'étape d'élongation finale (68°C ; 5 min), le

produit de la PCR est purifié à l'aide d'un kit de purification (QIA Ex II, Qiagen). Le produit d'amplification est dosé par spectrophotométrie dans une UVette et sa taille est vérifiée après migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 1,5%.

#### **II.3.b.d. Amplification des ADNc d'intérêt**

Les ADNc amplifiés et leurs conditions d'amplification par PCR en "temps réel" sont présentés dans le tableau 8. Les séquences des amorces et les conditions d'amplification du ScDNA sont protégées par le brevet WO2004.092414. Pour chaque couple d'amorces, nous avons sélectionné le kit d'amplification le plus performant, c'est-à-dire celui pour lequel la meilleure efficacité de PCR était obtenue (voir tableau 8). Les amplifications sont réalisées soit avec le kit *QuantiTect SYBR Green I* produit par Qiagen (le volume réactionnel de 20  $\mu$ L contient 5  $\mu$ L d'ADNc de l'échantillon, 4  $\mu$ L d'eau UP, 1  $\mu$ L d'amorce sens et anti-sens à la concentration de 10  $\mu$ M chacune et 10  $\mu$ L du QuantiTect Master Mix 2X), soit avec le kit *LC FastStart DNA Master SYBR Green I* produit par Roche (le volume réactionnel de 10  $\mu$ L contient 5  $\mu$ L d'ADNc de l'échantillon, 2,75  $\mu$ L d'eau UP, 0,25  $\mu$ L d'amorces spécifiques sens et anti-sens à la concentration de 10  $\mu$ M chacune, 1  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> à la concentration finale de 3,5 mM et 1  $\mu$ L de HotStart reaction mix 10X).

L'identification des ADNc amplifiés est permise grâce à l'étape de fusion réalisée après le dernier cycle d'amplification. Cette étape consiste en la dénaturation de tous les ADNc présents dans le milieu réactionnel par une montée rapide de température à 95°C à la vitesse de 20°C/sec. Puis, la température est descendue à la même vitesse jusqu'à une température supérieure de 10°C à celle d'hybridation des amorces, et cela pendant 20 sec pour permettre au SYBR Green de s'intercaler dans tous les doubles brins d'ADN amplifié. Enfin, la température est très lentement élevée à la vitesse de 0,1°C/sec accompagnée d'une lecture de fluorescence en continue. La décroissance de la fluorescence associée à la dénaturation très lente des ADNc permet d'obtenir la température de fusion, qui est spécifique d'un ADNc donné. Quand la PCR génère un seul produit d'amplification, la courbe de fusion ne dévoile qu'un seul pic.

ADNc	Dénaturation initiale	Amplification			Fusion		
		Dénaturation	Hybridation	Elongation	Dénaturation	Hybridation	Fusion
<b>BDNF</b>	95°C	95 °C	60 °C	72 °C	95° C	70 °C	98 °C
	10min	15 sec	7 sec	14 sec	0 sec	20 sec	0 sec
	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	95°C	95 °C	60 °C	72 °C	95° C	70 °C	98 °C
	10min	15 sec	7 sec	14 sec	0 sec	20 sec	0 sec
	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	95°C	95 °C	58 °C	72 °C	95° C	68 °C	98 °C
	15min	15 sec	30 sec	9 sec	0 sec	20 sec	0 sec
	20 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec
<b>IL-6</b>	95°C	95 °C	58 °C	72 °C	95° C	68 °C	98 °C
	15min	15 sec	30 sec	13 sec	0 sec	20 sec	0 sec
	20 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec
<b>A</b>	95°C	94°C	58 °C	72 °C	95° C	68 °C	98 °C
	15min	15min	30 sec	6 sec	0 sec	20 sec	0 sec
	20 °C/sec	15 °C/sec	15 °C/sec	15 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec
<b>B</b>	95°C	94°C	60 °C	72 °C	95° C	70 °C	98 °C
	15min	15min	30 sec	25 sec	0 sec	20 sec	0 sec
	20 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec
<b>C</b>	95°C	94°C	58 °C	72 °C	95° C	68 °C	98 °C
	15min	15min	20 sec	23 sec	0 sec	20 sec	0 sec
	20 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	10 °C/sec	20 °C/sec	20 °C/sec	0,1 °C/sec

**Tableau 8 : Conditions d'amplification des gènes d'intérêt par PCR en « temps réel » sur Light Cycler™ (Roche®) :**

L'amplification est réalisée en moyenne sur 45 cycles. A la fin de chaque cycle d'amplification, une lecture de fluorescence est réalisée à la longueur d'onde d'émission du SYBR Green I, qui ne fluoresce qu'une fois incorporé dans l'ADN double brin. L'étape de fusion permet de calculer la température de fusion spécifique ( $T_m$ ) de chaque ADNc et permet l'identification des produits amplifiés. ADNc « A » : Bad, Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-xs, Bid, IAP-1, IAP-2, IAP-3, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ . ADNc « B » : Epo, EpoR,  $\beta$ c, IGF-1. ADNc « C » : Tpo, TpoR.

## II.4 Dosage des protéines

### II.4.a Extraction des protéines totales sur homogénats tissulaires

Un tampon de lyse 2X incomplet est préparé avec du tris-amino (Euromedex), dont la concentration finale est de 39  $\mu$ M, et 500  $\mu$ L d'EDTA 0,5 M à pH 8 (Euromedex) dans 500 mL d'eau UP. Le pH de ce tampon est ajusté à 7,5 avec une solution de HCl 6 N. Le Nonidet P-40 (Roche) (0,06  $\mu$ L) est ajouté à un volume de 30  $\mu$ L de tampon de lyse 2X ainsi que 0,1% de DTT (Euromedex) et 0,25  $\mu$ L d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC pour *Protease Inhibitor Cocktail*) (Sigma) pour constituer le tampon de lyse 2X complet. Les 30  $\mu$ L d'homogénats tissulaires décongelés sont incubés pendant 20 min à 4°C en présence de 30  $\mu$ L de tampon de lyse 2X complet. Après avoir prélevé le surnageant (~40  $\mu$ L), un volume de 5  $\mu$ L est mélangé à 95  $\mu$ L d'eau UP. Les 35  $\mu$ L de protéines restants sont congelés à -80°C jusqu'à utilisation.

#### **II.4.b Dosage des protéines solubles totales par la méthode de BCA**

Pour le dosage des protéines solubles totales, nous avons utilisé le kit fourni par Sigma à base d'acide bicinchoninique. Nous avons préalablement préparé une gamme étalon de concentration décroissante de sérum d'albumine bovin (BSA pour *Bovin Serum Albumin*). 25 µL de l'échantillon dilué au 20<sup>ième</sup> ou du point de gamme sont mélangés à 500 µL de réactif à base d'acide bicinchoninique, et sont incubés 15 min à 60°C dans un bain-marie. L'absorbance est mesurée à 560 nm par lecture spectrophotométrique sur un Biophotomètre (Eppendorf).

#### **II.4.c Dosage de l'EpoRH par la méthode ELISA**

*Remarque : Pour cette étude, les cerveaux ont été lavés de leur contenu sanguin par une perfusion intracardiaque avec une solution de NaCl à 0,9% pendant 2 min.*

L'EpoRH administrée par voie périphérique est dosée sur des homogénats de tissu cérébraux par la méthode ELISA (Kit *Human Erythropoietin Quantikine IVD* de R&D system). Pour ce faire, les structures cérébrales, qui sont pesées avant d'être congelées dans l'azote liquide, sont homogénéisées dans 300 µL de solution de NaCl à 0,9%. Après centrifugation des homogénats tissulaires (12 000 x g durant 20 min à 4°C), la concentration tissulaire en EpoRH est mesurée dans 100 µL de surnageant selon les recommandations du fournisseur. La technique ELISA en « sandwich » permet de détecter l'EpoRH en utilisant deux anticorps spécifiques différents, l'un fixé au fond du puits de la plaque ELISA et l'autre ajouté dans le milieu réactionnel après dépôt des échantillons de protéines. Une biotine est conjuguée au second anticorps et permet une révélation par la peroxydase conjuguée à la streptavidine. Une lecture de l'absorbance est réalisée à 450 nm pour chacun des puits contenant soit un standard, soit un point de gamme, soit un échantillon contenant de l'EpoRH. Au final, les quantités de d'EpoRH tissulaires sont déterminées grâce à l'élaboration d'une gamme de dilution allant de 0 à 200 mIU/mL d'EpoRH. Les résultats sont exprimés en mUI par gramme de tissu (mUI/gt).

### **II.5 Etudes histologiques**

#### **II.5.a Coloration au crésyl violet et repérage anatomique**

Lors de la coupe d'un cerveau, une coupe est marquée au crésyl violet tous les 240 µm pour repérer les structures anatomiques à l'aide d'un atlas stéréotaxique<sup>190</sup>. La coloration au crésyl violet marque les corps de Nissl, agrégats de réticulum endoplasmique granuleux des corps cellulaires. Le recalage anatomique réalisé à partir des coupes colorées au crésyl violet permet de sélectionner les coupes d'un même plan anatomique pour différents cerveaux. Les coupes sont montées sur des lames gélatinées

à 1%. Une fois sèches, elles sont plongées dans une solution de crésyl-violet-acétate (Crésyl-violet, Merck ; à 0,5% poids/volume,  $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$  12,2 mM, pH = 3,5) durant 5 min, déshydratées dans des bains successifs d'éthanol respectivement à 50% (1 minute), 70% (1 minute), 95% (10 min) et 100% (6 min), puis délipidées dans un bain de xylène (10 min) avant montage dans le milieu histologique DPX (Fluka).

### **II.5.b Coloration au *FluoroJade B***

La coloration au Fluor Jade B marque les polyamines telles que la cadavérine, la putrescine et la spermidine dans les cellules. Ces polyamines étant fortement augmentées dans les cellules en souffrance, le Fluor Jade B est considéré comme un marqueur de dégénérescence neuronale <sup>212</sup>. Les coupes sont montées sur lames SuperFrostPlus (Menzel-Glaser) avant d'être immergées dans des bains successifs d'éthanol à 80% et NaOH à 1% pendant 5 min, d'éthanol à 70% pendant 2 min, d'eau distillée pendant 2 min et enfin de permanganate de potassium à 0,06% sous agitation pendant 10 min. Après rinçage dans l'eau distillée, les lames sont plongées pendant 20 min dans une solution de Fluor Jade B à 0,0004% (Chemicon) préparée dans de l'acide acétique à 0,1%. Les lames sont placées dans l'obscurité durant le temps de l'incubation. Les lames sont ensuite rapidement rincées dans de l'eau distillée (3 fois 1 minute) et égouttées avant d'être séchées durant 10 min à 50°C. Enfin, les coupes sont placées dans un bain de xylène durant 1 minute puis montées dans un milieu DPX (Fluka). Les coupes marquées sont ensuite observées à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SP2 ; Leica microsystemes SA). Le Fluoro-Jade B est excité à une longueur d'onde de 480 nm et le logiciel d'analyse, couplé au microscope, récupère la fluorescence émise à l'aide d'un filtre fluorescéine/FITC, à une longueur d'onde de 525 nm (vert).

### **II.5.c Coloration TUNEL**

La technique du TUNEL (pour *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) est utilisée afin de détecter la fragmentation de l'ADN dans le noyau, véritable indicateur de mort cellulaire. La réaction de TUNEL consiste à polymériser un nucléotide dUTP (couplé à la fluorescéine) avec les extrémités 3' OH sortantes des brins d'ADN fragmentés. Cette réaction est catalysée par l'enzyme transférase déoxynucléotidyl terminale. Puis un anticorps anti-fluorescéine couplé à une peroxydase reconnaît la fluorescéine fixée aux brins d'ADN fragmentés.

Les coupes de cerveau sont montées sur lames SuperFrostPlus (Menzel-Glaser) avant d'être immergées dans des bains successifs de PBS 0,1M contenant 0,3% de Triton X100 (Sigma) pendant 30 min, de PBS 0,1M pendant 10 minute, et de PBS 0,1M contenant 0,1% de citrate de sodium et 0,1 % de Triton pendant 2 min à 4°C. Puis, 50 µl de mélange « TUNEL » (Kit Roche n° 1684817, *In Situ Cell Death Detection Kit-POD*) sont

déposés sur la coupe et laissés 1 heure à TA. Après avoir rincé les lames dans le PBS, 50  $\mu$ L de solution POD (contenant l'anticorps anti-fluorescéine couplé à la peroxydase) sont déposés sur les coupes et laissés 30 min à TA. Après rinçage dans du PBS, la révélation est réalisée par l'incubation des coupes pendant environ 8 min dans une solution de 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (D-4293, Sigma fast), contenant du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dans le kit de TUNEL utilisé, l'enzyme DNase n'est pas fournie. Elle est pourtant utile pour prévoir des coupes contrôles. Ici, nous avons incubé des coupes avec de la DNase (150 unités par coupes, kit n° 79254, Qiagen) pendant 20 minutes à TA. Le marquage était particulièrement intense dans de très nombreuses cellules. Après plusieurs rinçages, les coupes sont déshydratées dans des bains successifs d'éthanol à 50% (1 min), à 70% (1 min), à 95% (2x5 min) et à 100% (2x3 min), et enfin délipidées dans des bains de xylène (2x5 min). Après le dernier bain de xylène, elles sont montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage histologique DPX (Fluka).

## **II.5.d Détections immunohistochimiques**

### ***II.5.d.a Marquage colorimétrique***

Les coupes flottantes stockées dans la solution incongelable sont abondamment rincées avec une solution de PBS et placées durant une nuit à 4°C dans un bain de PBS 0,1 M (PBS). Les coupes sont incubées pendant 2 heures à température ambiante (TA) dans du PBS avec 0,3% de triton X100 et 2% de sérum normal d'âne (PBS-T-D) afin de saturer les sites antigéniques non spécifiques (qui fixent les anticorps). Pour saturer les biotines endogènes, le kit de Vector (n°SP2001) est utilisé et consiste en l'incubation des coupes pendant 10 min dans une solution d'avidine, puis après rinçage dans du PBS, à l'incubation pendant 10 min dans une solution de biotine. Après un rinçage de 5 min dans du PBS, les coupes sont incubées en présence de l'anticorps spécifique de l'antigène d'intérêt (anticorps primaire) dilué dans du PBS-T-D une nuit à TA sous faible agitation. La liste des anticorps primaires utilisés et les conditions d'incubation sont récapitulées dans le [tableau 9](#). Le lendemain, les coupes sont rincées dans du PBS, et incubées une nuit à 4°C sous faible agitation en présence d'anticorps secondaires conjugués à la biotine dilués dans du PBS-T-D ; ces anticorps secondaires sont dirigés contre les immunoglobulines G (IgG) de l'espèce ayant servi à la production de l'anticorps primaire utilisé. La liste des anticorps secondaires utilisés et les conditions d'incubation sont récapitulées dans le [tableau 9](#). Le jour suivant, les coupes sont rincées dans du PBS et incubées 15 min dans une solution 0,1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluée dans du PBS-T. Cette étape permet de saturer les peroxydases endogènes. Après une série de rinçages dans du PBS, les coupes sont incubées en présence du complexe avidine-biotine-peroxydase pendant 1 h à TA (Kit Vectastain Elite ABC peroxidase standard, VPK-6100, Vector), dilué à 1/1000 dans du PBS. Ce complexe se fixe aux biotines conjuguées aux anticorps

secondaires. Après rinçage dans du PBS, la révélation est réalisée par l'incubation des coupes pendant environ 6 à 10 min dans une solution de DAB (D-4293, Sigma fast). Les coupes sont rincées dans du PBS, puis montées sur lames SuperFrostPlus (Menzel-Glaser) dans une solution diluée de PBS (1/32<sup>e</sup>). Elles sont ensuite déshydratées dans des bains successifs d'éthanol à 50% (1 min), à 70% (1 min), à 95% (2x5 min) et à 100% (2x3 min), et enfin délipidées dans des bains de xylène (2x5 min). Après le dernier bain de xylène, elles sont montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage histologique DPX (Fluka).

### **II.5.s.b (Double) détection immuno-fluorescente**

Les coupes flottantes stockées dans la solution incongelable sont abondamment rincées avec une solution de PBS et placées durant une nuit à 4°C dans un bain de PBS 0,1 M (PBS). Le lendemain, les coupes sont incubées pendant 2 heures à TA dans du PBS-T-D contenant 2% de sérum normal d'âne, puis une nuit et un jour à 4 °C sous faible agitation, en présence d'une solution contenant les 2 anticorps primaires spécifiques des 2 antigènes d'intérêt, préparée dans du PBS-T-D. La liste des anticorps primaires utilisés et les conditions d'incubation sont précisées dans le [tableau 9](#). A partir du jour suivant, toutes les étapes de la détection immunofluorescente sont réalisées à l'abri de la lumière. Les coupes sont rincées et incubées dans une solution préparée dans du PBS-T-D contenant les 2 anticorps secondaires spécifiques des anticorps primaires précédemment utilisés (sous faible agitation durant une nuit à 4°C puis 2 h à TA); les 2 anticorps secondaires sont couplés à des fluorochromes différents (Alexa-488 ou Alexa-633). Après rinçages dans du PBS, les coupes sont montées sur lames SuperFrostPlus (Menzel-Glaser), séchées à TA et montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage histologique spécifique pour conserver la fluorescence (Vectashield, Vector). Ce milieu de montage contient du DAPI, un marqueur nucléaire qui fluoresce en bleu (excitation au laser).

#### **Détection de l'EpoR : astuce !**

L'antigène EpoR est difficile à marquer en immunohistochimie (colorimétrique et fluorescente). Après plusieurs mois de mise au point, nous avons trouvé deux astuces pour que le marquage EpoR soit homogène:

- faire une incubation à 4°C des coupes dans une solution de PBS 0,1M contenant 0,5% de Triton X-100 (Sigma). Cette étape perméabilise le tissu, et facilite ainsi la pénétration des anticorps dans la coupe.
- Toutes les incubations dans les anticorps (primaire et secondaire) sont réalisées à TA.

### **II.5.e Détections *in situ* des cellules infiltrantes dans le cerveau**

Afin de détecter les cellules immunitaires périphériques qui infiltrent le parenchyme cérébral, nous avons utilisé une méthode développée dans la thèse de Fabrice Navarro<sup>180</sup>. Brièvement, le principe de cette technique consiste à marquer les nombreuses chaînes de sulfate d'héparane présentes à la surface membranaire des cellules infiltrantes. Pour ce faire, nous avons développé un peptide dont la séquence correspond à une partie de l'enzyme héparanase qui lie spécifiquement les chaînes de sulfate

d'héparane. L'héparanase est une enzyme qui se fixe naturellement sur les chaînes de sulfate d'héparane afin de les dégrader. Le peptide présente une biotine à son extrémité C-terminal (Covalab) de telle sorte à ce qu'on puisse la détecter avec un complexe avidine biotine peroxydase couplé avec une réaction au DAB.

**Tableau 9: Anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunohistochimie.**

Antigène	source Ac	Type	Dilution	Fournisseur et référence
<i>Anticorps primaires</i>				
<b>NeuN</b>	souris	monoclonal	1/2000	MAB-377 ; Chemicon
<b>GFAP</b>	souris	monoclonal	1/2000	G-3893; Sigma
<b>CD-11b</b>	souris	monoclonal	1/2000	CBL-1512Z; Chemicon
<b>Epo</b>	lapin	polyclonal	1/250	sc-7956 ; Santa Cruz
<b>EpoR</b>	lapin	polyclonal	1/500	sc-697 ; Santa Cruz
<b>βc</b>	lapin	polyclonal	1/100	sc-678; Santa Cruz
<i>Anticorps secondaires conjugués à la biotine</i>				
<b>Anti-IgG de lapin</b>	âne		1/1000	711-066-152 ; Jackson ImmunoResearch
<b>Anti-IgG de souris</b>	âne		1/1000	715-065-151, Jackson ImmunoResearch
<i>Anticorps secondaires couplés à l'Alexa-488</i>				
<b>Anti-IgG de lapin</b>	âne	-	1/1000	A-21206; Molecular Probes
<i>Anticorps secondaires couplés à l'Alexa-633</i>				
<b>Anti-IgG de souris</b>	chèvre	-	1/1000	A-21052; Molecular Probes

Les coupes incubent pendant 2 heures (TA) dans du PBS-T-D. Les biotines endogènes sont ensuite saturées à l'aide du kit de réactifs d'Abcys (n°SP2001) selon les recommandations du fournisseur. Après un rinçage de 5 min dans du PBS, les coupes incubent une nuit à TA sous agitation, en présence d'une solution contenant le peptide biotinylé diluée à 10 µM dans de l'eau UP. Le jour suivant, les coupes sont rincées dans du PBS 0.1M et incubent 15 min dans une solution contenant 0,1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30% diluée dans du PBS-T. Après une série de rinçages dans du PBS, les coupes incubent pendant 1 h (TA) en présence du complexe avidine-biotine-peroxydase (Kit Vectastain Elite ABC peroxydase standard, VPK-6100, Vector), dilué au 1/1000 dans du PBS. Ce complexe se fixe aux biotines non-saturées dans le tissu, celles conjuguées au peptide biotinylé. Ensuite, les étapes sont identiques à celles décrites précédemment (voir la fin du paragraphe II.5.d.a).

Remarque :

Afin de réaliser des doubles marquages fluorescents des cellules marquées par notre peptide biotinylé (notamment avec l'EpoR), nous avons eu recours à la streptavidine conjuguée à l'Alexa-633 qui se lie à la biotine (Molecular Probes, n°2135).

## **II.5.f Acquisition d'image et analyses histologiques**

### ***II.5.f.a Marquage fluorescent***

#### ***II.5.f.a.a Acquisition par microscopie confocale***

Les acquisitions d'image par microscopie confocale sont réalisées au Centre Commun de Quantimétrie avec l'aide de Yves Tourneur et Denis Ressnikoff. Les coupes généralement marquées avec 2 fluorochromes sont observées en microscopie confocale (Leica TCS SP2 ; Leica microsystèmes SA). Les fluorochromes couplés aux anticorps secondaires présents sur les coupes sont excités à une longueur d'onde de 488 nm et de 633 nm. Le logiciel d'analyse du signal filtre la fluorescence émise par les différents fluorochromes : pour l'Alexa Fluor 488, le logiciel récupère la fluorescence entre 497 et 527 nm (vert) ; pour l'Alexa Fluor 633, le signal est recueilli pour des valeurs de longueur d'ondes comprises entre 550 et 663 nm (rouge). La profondeur « z » de chaque coupe est choisie lorsque le signal pour les différents fluorochromes est optimal. L'image est ensuite capturée (sur une moyenne de 8 images) pour les 2 fluorochromes et pour le DAPI en trois séquences consécutives. Afin de comparer le niveau de fluorescence des images, il est indispensable de les capturer avec des paramètres d'acquisition identiques (gain, offset, ...).

#### ***II.5.f.a.b Analyse d'image et quantification***

Une fois que les images des fluorochromes et du DAPI sont acquises par microscopie confocale, elles sont superposées à l'aide du logiciel Adobe Photoshop™ (version 8) afin d'identifier d'éventuelles co-localisation. La couleur jaune indique que les couleurs verte et rouge sont superposées, et donc que les deux antigènes marqués sont présents dans la même cellule. La couleur bleue est le marqueur nucléaire DAPI.

Si la capture des images est réalisée avec des paramètres d'acquisition identiques, il est possible de comparer les niveaux de fluorescence entre différentes coupes. Ainsi, nous pouvons mesurer le niveau de fluorescence de l'antigène EpoR (marqué en vert) dans les neurones (marqués en rouge) sur des coupes de cerveaux. Pour ce faire, des images sont capturées au grossissement X20 en microscopie confocale. Après superposition des images (vert et rouge) avec Photoshop™, nous les analysons avec le logiciel Visilog 6.3 (Noesis). Le niveau de fluorescence verte (EpoR) de chaque neurone est ainsi mesuré dans les différentes sections acquises.

### ***II.5.f.b Marquage colorimétrique***

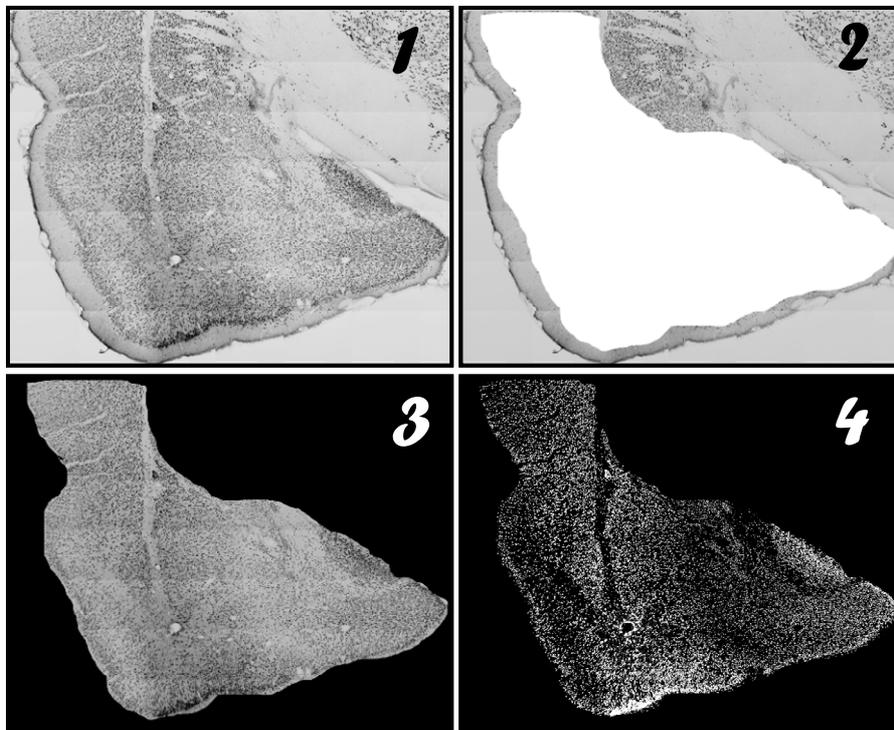
#### ***II.5.f.b.a Acquisition par microscopie optique***

Les coupes marquées sont observées à l'aide d'un microscope (Diaplan, Leitz). L'acquisition des images est réalisée grâce à une caméra vidéo 3CCD (DXC-930P ; Sony)

reliée au système d'analyse d'images Visilog 6.3 (Noesis). Ce système est également équipé d'une plateforme automatisée et permet de construire une mosaïque constituée de plusieurs images de haute qualité.

#### **II.5.f.b.b Analyse d'image et quantification**

A partir des images des régions d'intérêt, le logiciel Visilog 6.3 permet de mesurer la surface du marquage spécifique (voir figure 13). La valeur de la densité de neurone correspond à la surface du marquage neuronal normalisée par la surface totale de la région cérébrale délimitée (ici, la région ventrale limbique). Le choix d'exprimer ces résultats en densité de marquage plutôt qu'en nombre de cellules marquées résulte de l'impossibilité de distinguer les cellules dans les zones où le marquage est particulièrement dense.



**Figure 13: Étapes de quantification de la densité neuronale dans la région ventrale limbique. (1)** Mosaïque de la VLR sur une coupe marquée par immunohistochimie colorimétrique avec l'anticorps spécifique des neurones, NeuN. **(2-3)** La région d'intérêt (VLR) est délimitée. **(4)** Le seuillage du signal NeuN est réalisée à l'aide du logiciel Visilog 6.3 de telle sorte à ce que l'aire du marquage de l'image 4 représente la surface de l'ensemble des neurones de cette région cérébrale. Pour obtenir la densité de neurone dans cette région, nous avons réalisé le rapport de l'aire 4 sur l'aire 2.

## **PARTIE III : EXPERIMENTATIONS *IN VITRO***

### ***III.1 Conditions de culture***

La lignée cellulaire de phéochromocytome de rat PC12 est utilisée dans l'expérimentation *in vitro*. Les cellules sont maintenues en culture à 37°C dans des flacons de 175 cm<sup>2</sup> (Falcon) dans une atmosphère humidifiée à 90% contenant 95% d'air ambiant et 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture utilisé est le milieu de culture classique de Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Eurobio # CM1DME60K) auquel sont rajoutés 7% de sérum de cheval inactivé par la chaleur, 7% de sérum bovin de nouveau-né, et des antibiotiques (pénicilline à 80 U/mL et streptomycine à 80 mg/mL) (Eurobio). Ce milieu de culture, appelé milieu de culture complet des PC12 (MCPC12), est changé tous les 2 jours jusqu'à confluence des cellules.

### ***III.2 Préparation et traitements des cellules PC12***

Après avoir été décrochées mécaniquement, les cellules PC12 sont récoltées et comptées en utilisant un hémacytomètre. Elles sont ensuiteensemencées dans du MCPC12 à la densité de 300 cellules/mm<sup>2</sup> dans des boîtes de culture de 6 puits traités au collagène-I (BD Biocoat). Trois jours après, les cellules sont traitées avec 50 ng/mL de NGF recombinant 2.5S de souris (Promega) avec 1% de sérum de cheval inactivé par la chaleur et les antibiotiques dans le milieu de culture. Après traitement au NGF, les cellules sont récupérées 1 jour (J1) et 3 jours après (J3) avec 1 mL de Trizol (Euromedex). Des cellules non traitées au NGF sont aussi récupérées. L'extraction des ARN totaux est réalisée par ajout de 200 µL de chloroforme. Les étapes d'extraction, de purification et de vérification de non contamination en ADN génomique suivent les mêmes procédures que celles de la préparation des ARN extraits sur pièce tissulaire (voir paragraphe II.1.a.b des Méthodes).

# Résultats

---

## PAPIER N° 1

### Titre

**L'expression du récepteur de l'érythropoïétine coïncide avec celle de l'érythropoïétine, mais diffère de celle de la chaîne  $\beta$  commune dans le cerveau de rat au cours du développement postnatal et du vieillissement.**

### Etat

Accepté à The Journal of Comparative Neurology.

### Résumé

Qu'elle soit d'origine endogène ou exogène, l'Epo exerce des effets sur le SNC. Aujourd'hui, il n'existe pas de consensus sur *l'identité du récepteur responsable des effets de l'Epo dans le SNC*. Alors que certains scientifiques pensent que ce récepteur est un homodimère (EpoR)<sub>2</sub>, identique à celui présent sur les cellules souches hématopoïétiques, d'autres proposent que ce récepteur se compose d'un monomère d'EpoR et d'un homodimère ( $\beta$ c)<sub>2</sub>. Pourtant, à l'heure actuelle, *l'expression de la  $\beta$ c dans le cerveau n'a jamais été étudiée*. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle, si la  $\beta$ c fait réellement partie du complexe EpoR, les variations d'expression cérébrale de l'EpoR devraient mimer celles de la  $\beta$ c.

Nos objectifs principaux étaient donc:

- ➔ De comparer les variations d'expression cérébrale des gènes *Epo*, *EpoR* et  *$\beta$ c* du développement postnatal jusqu'au vieillissement; périodes pendant lesquelles de grands remaniements morphologiques opèrent dans le cerveau.
- ➔ D'étudier à ces différents âges le pattern d'expression de l'Epo, l'EpoR et la  $\beta$ c dans plusieurs structures cérébrales.

Nous montrons que:

- Les expressions cérébrales de l'Epo et de l'EpoR varient au cours de la vie. Par exemple, dans l'hippocampe, le pic d'expression de ces deux gènes est observé 2 jours après la naissance. L'expression de ces gènes diminue jusqu'à l'âge adulte et augmente au cours du vieillissement (voir figures P1.2 et P2.7).
- Alors que les variations d'expression des gènes *EpoR* et *Epo* sont parfaitement corrélées à tous les âges et dans les trois structures cérébrales étudiées (voir figure P1.7), les variations de l'expression de la  $\beta$ c ne miment jamais celles de l'EpoR (voir figure P1.2).
- L'analyse immunohistochimique montre que l'EpoR est présent dans de très nombreux neurones aux différents âges étudiés (voir figure P1.3). En revanche, la  $\beta$ c

est seulement exprimée par quelques neurones et quelques astrocytes (voir figures P1.5 et P1.6).

Dans cette étude, nous avons caractérisé pour la première fois l'expression de la  $\beta c$  dans le cerveau. Au regard des résultats obtenus, il est nécessaire d'être prudent quant à la participation de la  $\beta c$  dans les effets cérébraux de l'Epo. En effet, *le faible nombre de neurone exprimant la  $\beta c$  comparé aux nombreux neurones exprimant l'EpoR* d'une part, et le fait que *les variations d'expression de la  $\beta c$  ne soient jamais corrélées à celles de l'EpoR* d'autre part, indiquent qu'il est peu probable que le récepteur responsable des effets de l'Epo dans le cerveau soit composé de la  $\beta c$ . Ainsi, les résultats de notre étude encouragent la recherche de l'identité exacte de l'EpoR cérébral afin d'éviter l'élaboration de ligands à visée thérapeutique qui soient inappropriés.

## **Erythropoietin receptor expression is concordant with erythropoietin but not with common $\beta$ chain expression in the rat brain throughout lifespan**

Pascal E. Sanchez, <sup>1-5,†</sup> Fabrice P. Navarro, <sup>1-4,†</sup> Raafat P. Fares, <sup>1-5</sup> Jérémie Nadam, <sup>1,2</sup> Béatrice Georges, <sup>1-5</sup> Colette Moulin, <sup>1-5</sup> Marion Le Cavorsin, <sup>1-5</sup> Chantal Bonnet, <sup>1-5</sup> Philippe Ryvlin, <sup>5,6</sup> Amor Belmeguenai, <sup>1-5</sup> Jacques Bodennec, <sup>1-5</sup> Anne Morales, <sup>1-5</sup> Laurent Bezin <sup>1-5\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Lyon, F-69622, Lyon, France;

<sup>2</sup> Université Lyon 1, Villeurbanne;

<sup>3</sup> CNRS, UMR5123, Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire;

<sup>4</sup> IFR 41;

<sup>5</sup> Inserm, CTRS, Cognitive Development in Epilepsy;

<sup>6</sup> Hospices Civils de Lyon, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, Service de Neurologie Fonctionnelle et Epileptologie, F-69677, Bron.

† These co-authors contributed equally to the study.

\* Corresponding author.

### **Running title**

Brain erythropoietin receptor

### **Keywords**

Development, ageing, hippocampus, neocortex, hypothalamus, PC12 cells.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the CNRS and the Université Lyon 1. P.E. Sanchez is a fellow from the Délégation Générale pour l'Armement, Ministère français de la défense. We thank D. Ressnikoff, B. Smati and Y. Tourneur from the Centre Commun de Quantimétrie of the Université Lyon 1 for their assistance in the use of the confocal microscope.

## ABSTRACT

Brain effects of erythropoietin (Epo) are proposed to involve a heteromeric receptor comprising the classical Epo receptor (Epo-R) and the common  $\beta$  chain ( $\beta$ c). However, data documenting the pattern of  $\beta$ c gene expression in the healthy brain, in comparison with that of *Epo-R* gene, are still lacking. The present study is the first to investigate in the same time  $\beta$ c, *Epo-R* and *Epo* gene expression within different rat brain areas throughout lifespan, from neonatal stage to elderly, using quantitative RT-PCR for transcripts. Corresponding proteins were localized using immunohistochemistry. We demonstrate that  $\beta$ c transcript level does not correlate with that of Epo-R and Epo, while Epo-R transcript level strongly correlates with that of Epo throughout lifespan in all brain structures analyzed. Both Epo and Epo-R were primarily detected in neurons. In the hippocampus, greatest Epo-R mRNA levels were measured during the early postnatal period and in middle-aged rats, associated with an intense neuronal immunolabeling. Conversely,  $\beta$ c protein was barely detectable in the brain at all ages, even in neurons expressing high levels of Epo-R. Finally,  $\beta$ c transcript could not be detected in PC12 cells, even after NGF-induced neuritogenesis, which is a condition that dramatically enhanced Epo-R transcript level. Altogether, our data suggest that most neurons are likely to express high level of Epo-R, but low, if not null, level of  $\beta$ c. Considering that Epo protects extended populations of neurons after injury, a yet-to-be-identified receptor heterocomplex comprising Epo-R may exist in the large population of brain neurons that do not express  $\beta$ c.

## INTRODUCTION

Brain-derived erythropoietin (Epo) is a paracrine factor regulating physiological processes such as developmental and adult neurogenesis<sup>32,221,250</sup> and ventilatory acclimatization to hypoxia<sup>234</sup>. In addition, it is recognized as a potent endogenous neuroprotective molecule<sup>92,187</sup>. Its constitutive neuronal expression<sup>176</sup> can counteract neuronal death in mild-brain injuries<sup>207</sup>, and its induced expression within astrocytes<sup>18,85,176</sup>, microglia and endothelial cells<sup>18</sup> following severe damages is supposed to prolong neuroprotection and support tissue restructuring. Recombinant Epo (rEpo), when administered peripherally at high dose, concentrates within the cerebrospinal fluid<sup>24,60,117</sup> and within the brain parenchyma<sup>176</sup>. It then confers cytoprotection and functional protection in a wide variety of *in vivo* neurological disease models both at early postnatal stages and adulthood<sup>32,53,92,133,162,176,237</sup>. Encouraging results on the neuroprotective/neurotrophic efficacy of rEPO in humans have been obtained from clinical trials involving stroke patients<sup>60</sup>, patients with chronic schizophrenia<sup>62,92</sup>, and patients with chronic progressive multiple sclerosis<sup>59</sup>.

Recent data using transgenic mice with brain downregulation of the classical Epo receptor "Epo-R"<sup>32,250</sup> or deletion of the common  $\beta$  chain ( $\beta$ c)<sup>23</sup> have suggested that both proteins are constituents of the heteromeric receptor mediating neuroprotective effects of Epo. It has been proposed that this receptor complex comprises a single unit of Epo-R and a homodimer of  $\beta$ c<sup>22,23,137</sup>. The  $\beta$ c is a subunit shared by receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and interleukin (IL-3) and IL-5<sup>48</sup>. However, two recent studies, the former showing that Epo prevents apoptosis in

differentiated neuroblastoma cells that do not express detectable level of  $\beta c$ <sup>255</sup>, the latter providing evidence that rEpo protects neurons in the adult rat hippocampus, where  $\beta c$  is barely detectable compared to the large distribution of Epo-R<sup>176</sup>, raised the possibility that rEpo can also mediate neuroprotective effects through a receptor complex that does not comprise  $\beta c$ .

Today, rEpo is one of the most tested neuroprotective molecules in animal models of brain degenerative processes. However, the threat that repeated high doses of rEpo may cause adverse vasoactive properties<sup>42</sup>, in particular within brain tissue through increased erythrocytosis<sup>22,156</sup>, and adverse angiogenic effects<sup>201</sup> have spurred the development of Epo derivatives that are neuroprotective, but not erythropoietic<sup>137</sup>. It is therefore of first importance to improve from *in vivo* studies our knowledge of the potential components of the receptor complex mediating the neuroprotective effects of Epo, which is an important issue to prevent misleading ligands to be engineered. In order to investigate the likelihood that Epo-R systematically associates with  $\beta c$  in brain tissue, we postulated that  $\beta c$  expression *in vivo* should mirror that observed for Epo-R.

Brain mapping of Epo-R protein using commercially available antibodies has been a matter of intensive debate due to the production of diverging results<sup>65,94,125,260</sup>. Concerning  $\beta c$ , a single antibody has been used so far to detect its presence in the brain of mouse and rat<sup>23,176</sup> and in neuron-like cells of human and rat origins<sup>255</sup>. Hence, it has recently been proposed that the less controversial approach to analyze the expression pattern of *Epo-R* gene at the present time is to measure changes in its transcript level<sup>224</sup>, a proposition that can be extended to any other associated subunit. We

thus compared the expression patterns of Epo-R and  $\beta c$  transcript levels in the rat hippocampus, neocortex and hypothalamus throughout postnatal development and ageing. We also determined variations in *Epo* gene expression and plotted transcript levels of Epo together with those of Epo-R or  $\beta c$ . Since Epo has been shown to protect PC12 cells against various noxious stimuli<sup>129,255,285</sup>, we then extended our analysis using differentiated PC12 cells. Finally, we refined the characterization of the antibody frequently used to detect Epo-R in brain cells<sup>23,32,74,176,209</sup>, and compared the results obtained using this antibody to those obtained with the antibody used to detect  $\beta c$  on adjacent sections.

## MATERIALS AND METHODS

### Experimental design

*Experiment 1: Transcript levels of Epo system constituents throughout postnatal development and ageing.* To determine the levels of mRNAs encoding key proteins of the Epo system (i.e. Epo, Epo-R, and  $\beta c$ ), animals were sacrificed at 2D (n=7), 8D (n=7), 14D (n=5), 21D (n=5), 3M (n=5) and 12M (n=5) following a lethal injection of pentobarbital (250 mg/kg). The hippocampus, the neocortex and the hypothalamus were rapidly removed and frozen in liquid nitrogen. Dissected tissues were then prepared for real time PCR amplification of cDNAs of interest after reverse transcription (RT) of total mRNAs.

*Experiment 2: In situ characterization of neural cells expressing Epo system constituents throughout postnatal development and ageing.* To localize and characterize cells expressing Epo, Epo-R and  $\beta c$ , rats were deeply anesthetized (lethal intraperitoneal injection of pentobarbital at 250 mg/kg) at 5D (n=5), 21D (n=5), 3M (n=5) and 12M (n=5) and

transcardially perfused with chilled 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer at flow rates of 15 mL/min for 4 min (5D) and 30 mL/min for either 6 min (21D) or 9 min (3M and 12M). After cryoprotection in 25% sucrose, brains were frozen in isopentane and stored at -80°C.

*Experiment 3: Epo-R and  $\beta$ c transcript levels in PC12 cells.* The levels of mRNAs encoding Epo-R and  $\beta$ c were determined in PC12 cells, during their exponential growth period, and after their neuronal differentiation induced by nerve growth factor (NGF) treatment.

### Biological material

**Animals.** All animal procedures were in compliance with the guidelines of the European Union (directive 86/609), taken in the French law (decree 87/848) regulating animal experimentation. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Sprague-Dawley male rats (Harlan, France) were used throughout the experiments. Rats used during the first 3 weeks of life arrived at 1 day old with foster mothers in approved facilities, and housed at  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  under diurnal lighting conditions (lights on from 06:00 to 18:00). Rats used at 3 and 12 month- (M) old arrived at the animal facility 3 weeks before the experiments started. Pups were maintained in groups of 10 with their foster mother until postnatal day (D) 21. Older rats (3M and 12M) were maintained in groups of 5 in plastic cages. All rats (foster mothers and adult rats) had free access to food and water.

**PC12 cells.** Rat PC12 cells were maintained in tissue culture flasks in a humidified (90%) atmosphere of 95% air / 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. The culture medium ("PC12 complete medium", PC12CM) consisted of Duplecco's modified

Eagle's medium (DMEM, Eurobio # CM1DME60K) supplemented with 7% heat-inactivated horse serum, 7% newborn bovine serum and antibiotics (80 units/mL penicillin and 80 mg/mL streptomycin). Culture medium was changed every 2 days. After mechanical dislodging, PC12 cells were seeded in Biocat collagen I-treated 6-well plates (Becton Dickinson) at the density of 300 cells / mm<sup>2</sup> in PC12CM. Three days later (day 0; D0), they were either harvested for total RNA preparation, or treated with 50 ng/mL mouse recombinant 2.5S NGF (Promega) in DMEM completed with 1% horse serum and antibiotics. NGF treated-PC12 cells were then harvested for total RNA preparation at D1 and D3 post-treatment.

### Methods

**Reverse Transcriptase real time Polymerase Chain Reaction (RT-real time PCR).** Total RNAs were extracted with Tri-reagent LS (Molecular Research center, Inc.) and genomic DNA was removed after treatment with Turbo DNA free (Ambion) following manufacturer's instructions. Prior to reverse transcription, total RNA from all samples were shown to be free of genomic DNA contamination by a PCR amplification of the exon V of the gene encoding brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (see below for details). Messenger RNAs, contained in 500 ng of hippocampal total RNAs, were then reverse transcribed with the reverse transcriptase RNase H minus (Promega) using oligod(T)<sub>15</sub>, in the presence of 80 pg of a synthetic external and non-homologous poly(A) Standard RNA (SmRNA) used to normalize the reverse transcription of mRNAs of biological samples (Morales and Bezin, patent WO2004.092414). cDNAs obtained from the reverse transcription of targeted mRNAs were quantified by real time

PCR performed on the LightCycler® System (Roche Diagnostics) using the QuantiTect SYBR®Green PCR Kit (Qiagen) for the SmRNA, Epo, and Epo-R, or the FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics) for BDNF. All PCR fragments were confirmed by sequencing. Results obtained for the targeted mRNAs were normalized against the SmRNA. Sequences of the different primer pairs used are: BDNF(exV) (GenBank accession no. X67108) forward 5' AAA TTA CCT GGA TGC CGC AA 3', reverse 5' CGC CAG CCA ATT CTC TTT TT 3' (345 bp); Epo (GenBank accession no. NM\_017001) forward 5' GCT CCA ATC TTT GTG GCA TC 3', reverse 5' ATC CAT GTC TTG CCC CCT A 3' (66 bp); Epo-R (GenBank accession no. D13566) forward 5' CCA GCT CTA AGC TCC TGT GC 3', reverse 5' CTT CAG GTG AGG TGG AGT GG 3' (68 bp);  $\beta$ c (GenBank accession no. NM\_133555.1) forward 5' CCT GGT GGC TCT CTG CTG 3', reverse 5' GCA GAG TCT TCA GAG GGA CAG T 3' (68 bp). All primer pairs were designed using "Primer 3" software (NIH; www.basic.nwu.edu).

**Fluorescent dual-immunolabelings.** Nine series of dual-immunolabelings were performed on free-floating sections from paraformaldehyde-fixed tissue. Each series consisted of incubating sections with an antibody raised against either Epo, or Epo-R, or  $\beta$ c together with an antibody raised against either NeuN, or GFAP, or OX-42. In each series, sections from all brain regions and all ages of interest were processed together. Primary antibodies were used at the following dilutions: 1:100 for the rabbit polyclonal anti- $\beta$ c antibody (sc-678; Santa Cruz), 1:250 for the rabbit polyclonal anti-Epo antibody (sc-7956; Santa Cruz), 1:500 for the rabbit polyclonal anti-Epo-R antibody (sc-697; Santa Cruz), 1:1000 for the mouse monoclonal anti-

NeuN antibody (MAB-377; Chemicon), 1:2000 for the mouse monoclonal anti-OX-42 antibody (CBL1512Z; Chemicon), and 1:2500 for the mouse monoclonal anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) antibody (G3893; Sigma). Sections were then mounted on SuperFrost®Plus slides and coverglassed with Prolong Gold Antifade reagent (Molecular Probes). All sections belonging to a same series of dual-immunolabeling were then analyzed at identical conditions of photomultiplier gain, offset and pinhole aperture using a TCS SP2 confocal microscopy system (Leica), allowing the comparison of fluorescence intensity between regions of interest at all ages examined. Images were finally imported into Adobe Photoshop 8.0.1 (Adobe Systems) for further editing.

#### **Antibody characterization.**

1. For Epo-R, a polyclonal rabbit antibody (Santa-Cruz # sc-697 (M-20)) raised against amino acids 488-507, mapping at the C-terminal cytoplasmic domain (amino acids 273-507) of the precursor form of mouse EpoR was used. This antibody reveals in rat brain homogenates a single band slightly above the expected 66 kDa size<sup>74,125</sup>. Brain mapping of Epo-R protein using this antibody has been a matter of intensive debate due to the production of diverging results<sup>125</sup>. Its specificity has then been questioned in a report showing immunolabeling in Epo-R-knockout mice (Epo-R<sup>-/-</sup>)<sup>65</sup>. However, conclusions raised from these Epo-R<sup>-/-</sup> mice must be taken with caution, since Epo-R gene, which is composed of eight exons, has been silenced by deletion of exons 1-6 only<sup>74,284</sup>. In the eventuality of a chimeric protein, partly encoded by the remaining exons 7-8, a signal may be obtained with the M-20 antibody, which is directed against an epitope encoded by exons 7-8 of the Epo-R gene. Here, we

clearly show a complete abolition of Epo-R immunohistofluorescent labeling in rat brain tissue sections, when this antibody was pre-incubated with a 5-fold excess of the M-20-immunizing peptide (sc-697P) (Fig. P1.1A,B), in line with results published by others<sup>88</sup>.

2. For Epo, a polyclonal rabbit antibody (Santa-Cruz # sc-7956 (H-162)) raised against amino acids 28-189 from mature human Epo was used. This antibody stains a single 33 kDa band in western blot analysis of Epo expression in Normal Rat Kidney cell line transformed by the Kirsten murine sarcoma virus (KRNK cells) (manufacturer's technical information).

3. For  $\beta c$ , a polyclonal rabbit antibody (Santa-Cruz # sc-678 (K-17)) raised against amino acids 877-893 mapping at the C-terminal of the precursor form of the mouse  $\beta$  chain common to IL-3, IL-5 and GM-CSF receptors was used. This antibody recognizes a specific band in a RBL-2H3 rat basophilic leukemia cell line<sup>255</sup>, and has been used to detect  $\beta c$  in mouse<sup>23</sup> and rat<sup>176</sup> brain sections. In addition, a complete abolition of  $\beta c$  immunohistofluorescent labeling in rat brain tissue sections has been obtained (Fig. P1.1C-D) when this antibody was pre-incubated with a 5-fold excess of the K17-immunizing peptide (sc-678P).

4. For the detection of neuronal cell type in brain slices, we used the monoclonal mouse antibody (Chemicon # MAB-377) raised against undetermined nuclear proteins of neurons (NeuN). This antibody recognizes 2-3 bands in the 46-48 kDa range and possibly another band at approximately 66 kDa (manufacturer's technical information). Even if the sequence of the immunizing antigen(s) has not been established yet, this antibody has been shown to stain neurons exclusively, both in vivo and in vitro, recognizing most of neuronal cell types throughout the central nervous system of numerous vertebrates<sup>174</sup>.

5. For the detection of microglia/ macrophage cell type in brain slices, we used a monoclonal mouse antibody Ox-42 (Chemicon CBL1512Z) raised against the integrin chain CD11b of rat peritoneal macrophages. This antibody precipitates three polypeptides of 150, 103 and 95 kDa (manufacturer's technical information), and recognizes alphaM integrin chain, expressed by quiescent and activated microglia, pericytes and infiltrating macrophages in brain tissue<sup>89</sup>.

6. Mouse anti-GFAP (Sigma # G3893, monoclonal, immunogen: whole GFAP protein from pig spinal cord) reacts specifically with GFAP in immunoblotting assays and labels astrocytes in brain tissue sections (manufacturer's technical information).

Statistical Analysis. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of the mRNA level and are compared among groups by using one-way ANOVA followed by Fisher's protected Least Significance Differences (LSD) test.

## RESULTS

### ***Expression profile of brain Epo receptor (Epo-R) in postnatal development and ageing***

Among the three brain structures examined (hippocampus, neocortex and hypothalamus), the hippocampus is the one that exhibited the greatest changes in Epo-R-mRNA levels during postnatal development and ageing, and Epo-R-mRNA level was higher at 12M than at 3M (Fig. P1.2A-C).

Fluorescent labeling of Epo-R was detected at all stages examined, as illustrated in the neocortex and the dorsal hippocampus (Fig. P1.3). Dual fluorescent labelings of Epo-R together with either neuronal marker NeuN, or microglial marker Ox-42, or astroglial marker

GFAP revealed that Epo-R was expressed, above detection threshold, exclusively by neurons at all stages examined (5D, 21D, 3M and 12M) in the three brain structures analyzed. We provide typical illustrations of dual fluorescent labelings in the area CA1, at 5D for Epo-R/NeuN (Fig. P1.3Q), and at 12M for Epo-R/Ox-42 (Fig. P1.4A-C) and Epo-R/GFAP (Fig. P1.4D-F).

At 5D, Epo-R was also detected in capillaries within the neocortex and the hippocampus (see asterisks in Fig. P1.3Q). It is also within these two latter structures that a highly intense fluorescent labeling was found in numerous round-shaped cells (Fig. P1.3A-D), that all appeared to be neurons (see white arrows; Fig. P1.3Q). In the hippocampus, these neurons were localized in the stratum oriens of area CA1 (Fig. P1.3B), in the pyramidal layer of area CA3 (Fig. P1.3C), and in the hilus of dentate gyrus (Fig. P1.3D). In area CA3, the neurons exhibiting intense Epo-R labeling were intermingled with differentiated pyramidal neurons.

At 21D, Epo-R fluorescent labeling appeared in neuronal processes in the neocortex (Fig. P1.3E) and pyramidal neurons of area CA1 (Fig. P1.3F), and, to a lesser extent, in pyramidal layer of area CA3 (Fig. P1.3G) and hilar neurons (Fig. P1.3H). Some neurons in area CA3c were also intensely labeled, while a weak signal was observed in the granule cell layer of the dentate gyrus (Fig. 3H).

From 21D to 3M, the signal became stronger in basal dendrites of pyramidal neurons laying within the stratum radiatum (Fig. P1.3J), in all pyramidal neurons of the Ammon's horn, in particular within CA3 (Fig. P1.3K), and in granule cells of the dentate gyrus (Fig. P1.3L). During ageing, from 3M to 12M, the Epo-R labeling gained in intensity, particularly within dendrites of CA1 pyramidal neurons (Fig. P1.3N), within perikarya of CA3 and CA3c

pyramidal neurons (Fig. P1.3O-P), and within granule cells (Fig. P1.3P).

### ***Expression profile of brain common $\beta$ chain ( $\beta$ c) in postnatal development and ageing***

$\beta$ c transcript was expressed in the hippocampus at a higher level during early postnatal development (2D, 8D and 14D) and ageing (12M) than at the adult stage (3M) (Fig. P1.2D). In the hypothalamus and the neocortex, the apparent peaks of  $\beta$ c transcript level were observed in adult (3M) and middle-aged (12M) rats, respectively (Fig. P1.2E-F). The comparisons of the data obtained in the three brain structures at all ages examined, between  $\beta$ c and Epo-R, did not reveal any significant correlation (Fig. P1.2G).

Fluorescent labeling of  $\beta$ c was scarce in all structures analyzed. Dual fluorescent labelings of  $\beta$ c together with neuronal marker NeuN indicated that few neurons expressed  $\beta$ c in the hippocampus and the neocortex at 21D (Fig. P1.5C-D), 3M (Fig. P1.5E-F) and 12M (Fig. P1.5G-H).  $\beta$ c labeling was never detected in microglia, as illustrated at 12M in area CA1 (Fig. 6A-C). However,  $\beta$ c was frequently detected in astrocytes at 3M and 12M, as exemplified at 12M in area CA1 according to morphological features (see arrowheads in Fig. P1.5) and to dual fluorescent labeling with GFAP (Fig. P1.6D-G).

### ***Expression profile of brain Epo in postnatal development and ageing***

Epo transcript levels measured in the hippocampus (Fig. P1.7A), the neocortex (Fig. P1.7B) and the hypothalamus (Fig. P1.7C) exhibited profiles throughout postnatal development and ageing similar to those found for the Epo-R transcript (Fig. P1.2A-C). In the hippocampus, Epo-mRNA tissue concentration was maximal 2 days (2D) after birth, and then

decreased to reach, as soon as 14D, the value measured at the adult stage (3 months, 3M). From 2D to 3M, we measured a 10-fold decrease in Epo-mRNA level, followed by 5-fold increase between 3M and 12M (Fig. P1.7A). In the neocortex, Epo-mRNA level was at its greatest value at 2D, and dropped to the tissue concentration measured in young adults (3M) at 8D (Fig. P1.7B). Interestingly, the comparison of the data obtained between Epo and Epo-R or  $\beta c$  transcript levels, determined in the three brain structures at all ages analyzed, revealed a highly significant correlation between Epo and Epo-R (Fig. P1.7D), but not between Epo and  $\beta c$  (Fig. P1.7E)

Fluorescent labeling of Epo was detected at all stages examined, as illustrated in the dorsal hippocampus (Fig. P1.8). Dual fluorescent labelings of Epo together with either NeuN, or GFAP, or Ox-42 revealed that Epo was expressed, above detection threshold, primarily by neurons at all stages examined (5D, 21D, 3M and 12M) in the three brain structures analyzed. At 5D, Epo labeling was barely detectable in neuronal perikarya (Fig. P1.8A), but appeared as a dense punctuate signal, which may reflect the presence of Epo in numerous neuronal varicosities, as illustrated in the stratum radiatum of area CA1 (Fig. P1.8B). The density of this punctuate varicose labeling was dramatically reduced at the other stages examined (Fig. P1.8A), contrasting with the increase in perikaryal labeling, as illustrated in the dentate gyrus and the pyramidal layer of area CA1 (Fig. P1.8A). In these hippocampal areas, the intensity of the perikaryal labeling increased dramatically in middle-aged rats (12M) compared to young adult rats (3M) (Fig. P1.8A). Qualitative observations in the neocortex were similar to those reported in the hippocampus (data not shown). By contrast, Epo labeling within the

hypothalamus was primarily observed in neuronal perikarya, and remained unchanged throughout postnatal development and ageing (data not shown). Epo was never detected in microglia, as illustrated at 12M in area CA1 (Fig. P1.9A-C), and in scarce astrocytes (as exemplified by the white arrowhead in Fig. 9D-F).

### **Expression of Epo-R, $\beta c$ and Epo in PC12 cells**

$\beta c$  transcript could not be detected both in undifferentiated (Fig. P1.10A, curve 7) and neuronal-differentiated PC12 cells (Fig. P1.10A, curve 6). In contrast, Epo-R transcript was easily detected in undifferentiated PC12 cells (Fig. P1.10A, curve 4), with  $33,300 \pm 5,661$  Epo-R cDNA copies quantified by real time PCR following reverse transcription of mRNAs contained in 500 ng of total RNAs. Epo-R transcript levels increased by  $+780 \pm 199\%$  ( $p < 0.01$ , ANOVA 1) and  $+1,658 \pm 181\%$  ( $p < 0.001$ ) after 1 day and 3 days (Fig. P1.10A, curve 3) of NGF-treatment, respectively (Fig. P1.10B). Epo transcript was barely detected in undifferentiated PC12 cells, with  $40.0 \pm 27.1$  Epo cDNA copies quantified by real time PCR. Epo transcript levels increased by  $+1,272 \pm 135\%$  ( $p < 0.01$ ) and  $+858 \pm 153\%$  ( $p < 0.01$ ) after 1 day and 3 days of NGF-treatment, respectively. The maximal number of Epo cDNA copies detected was 542 in differentiated PC12 cells.

## **DISCUSSION**

Recent data using transgenic mice with brain downregulation of Epo-R<sup>32,250</sup> or deletion of  $\beta c$ <sup>23</sup> have suggested that both proteins are constituents of the heteromeric receptor mediating neuroprotective effects of Epo<sup>22</sup>. However, data documenting the pattern of  $\beta c$

gene expression in the healthy brain, in comparison with that of *Epo-R* gene, are still lacking. Here, we tested whether alterations of  $\beta c$  expression during brain development and ageing mirrored that of both *Epo-R* and *Epo*. For the first time, we provide evidence that brain *Epo* gene expression is concordant with that of *Epo-R*, but not  $\beta c$ , throughout lifespan.

### **Methodological considerations.**

$\beta c$  was successfully detected by others in the mouse spinal cord and cerebellum (Brines et al., 2004), with the antibody used in our study. We previously reported that  $\beta c$  was barely detectable in the neocortex and hippocampus of the adult rat <sup>176</sup>. Here,  $\beta c$  was detected in sparse neurons throughout lifespan, and rare astrocytic processes in middle-aged rats. It is unlikely that this discrete distribution of  $\beta c$  in the brain is due to a weak capability of the antibody to bind  $\beta c$ . Indeed, we already showed that elevation in  $\beta c$  transcript level following excitotoxic damage was associated with an increased immunolabeling in the hippocampus, primarily over microglial cells <sup>176</sup>.

Both *Epo-R* and  $\beta c$  antibodies used in this study have been raised in rabbits, therefore precluding the possibility of a double-immunofluorescent labeling of both proteins. The mouse monoclonal anti-*Epo-R* antibody MAB307 (R&D Systems) was not used instead of M-20 antibody for that purpose, because it is not suitable to detect *Epo-R* from rat samples by western blotting procedures <sup>125</sup>.

### **Concordant regulation of *Epo* and *Epo-R* gene expression in brain throughout lifespan.**

Previous studies showed that *Epo-R* gene expression considerably varied during embryogenesis at both transcript <sup>146</sup> and protein <sup>126</sup> levels, the adult values being

reached during the perinatal period. Here, we have refined the analysis of *Epo-R* gene expression throughout lifespan. We show that, while being weaker than those reported during the embryonic period, variations in *Epo-R* gene expression persist until elderly, affecting various brain areas differently. These variations are highly correlated with those of *Epo* gene expression, suggesting that endogenous *Epo* may control *Epo-R* gene expression throughout lifespan. Indeed, increased *Epo-R* transcript level in neuronal cell lines involves the transcription factor GATA-3, the expression of which is stimulated by *Epo* <sup>292</sup>.

This study provides evidence that *Epo-R* immunolabeling is restricted to some neuronal populations within the forebrain, in particular the hippocampus. To date, the molecular mechanisms governing such a neuronal distribution of *Epo-R* remain to be determined. This result strongly suggests that a large number of neurons of the central nervous system have no (or a weak) capacity to respond to *Epo* under basal conditions. However, the capacity to bind *Epo* may be enhanced in extended brain cell populations, including neurons, during adaptation/acclimation to environmental challenge, since *Epo-R* gene expression has been shown to increase in the neocortex following heat acclimation <sup>220</sup>.

We observed that *Epo* immunoreactivity in neurites (dendrites and or axons) was considerably high at early postnatal stages. It may be possible that presence of *Epo* in neuronal processes supported autocrine/paracrine regulation of dendritic and axonal outgrowth, as recently demonstrated both *in vivo* and *in vitro* <sup>26,131,196</sup>.

### **Epo-R is markedly up-regulated in the hippocampus of neonatal and middle-aged rats.**

Here we show that numerous cortical and hippocampal round-shaped neurons expressed high levels of Epo-R at postnatal day 5. This result is of particular interest, considering that these cells may be the target of rEpo, which is often administered in very low birth weight newborns to prevent, or reduce, the number of transfusions<sup>20,28</sup>. The safety of repeated high doses of rEpo has recently been reported in the neonatal rat<sup>162</sup>. However, in light of the present data, further experimentations are required in animals to estimate long-term consequences of neonatal rEpo treatment, by evaluating fine neuronal patterning and cognitive functions later in life.

While *Epo-R* gene expression reached its lowest level in young adult rats (3 months), we observed that both Epo-R transcript and protein were increased in the hippocampus of middle-aged rats (12 months). This increase was accompanied with that of Epo, thus preceding the dramatic decrease in Epo detection reported in the cerebral cortex and the hippocampus of aged (24-29 months) rats<sup>41</sup>. The hippocampus is particularly susceptible to age-related degeneration, especially after 17 months of age<sup>86,120</sup>. Thus, maintaining Epo at a high tissue level from 12 months of age via rEpo administration at neuroprotective doses may help to maintain *Epo-R* gene expression at a high level, and then to prolong neuronal robustness and cognitive functions in aged rats. Interestingly, weekly administered rEpo significantly improved cognitive function in schizophrenic patients<sup>62</sup>, who express higher levels of Epo-R in neurons and astrocytes in the hippocampus and the neocortex compared to controls<sup>58</sup>.

### **Can the heteromeric receptor mediating brain effects of Epo comprise $\beta c$ ?**

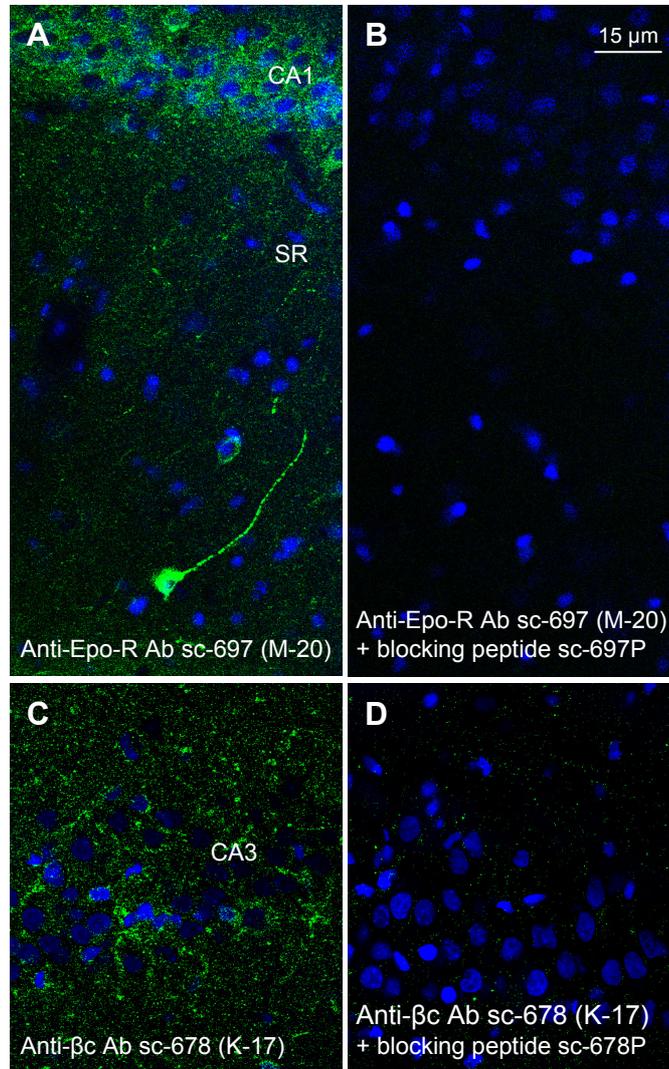
Epo derivatives, which are neuroprotective but not erythropoietic, such as carbamylated Epo (CEPO), displayed a weak affinity for Epo-R homodimer<sup>137</sup>, indicating that CEPO, and likely Epo, might bind to an alternate receptor to mediate cytoprotective effects. On the basis of observations showing that: 1) Epo induces tyrosine phosphorylation of  $\beta c$ <sup>90</sup> and functionally associates with Epo-R<sup>115</sup> in hematopoietic cell lines, and 2)  $\beta c$  knock-out mice treated with either CEPO or rEpo after spinal cord injury did not recover the optimal motor activity usually observed in wild-type mice treated with CEPO<sup>23</sup>, it has been proposed that a receptor comprising a single Epo-R and a homodimer of  $\beta c$  was mediating the cytoprotective effects of Epo<sup>22</sup>.

Our previous data obtained in adult rats questioned the possibility that such a receptor complex may be largely present in the brain by comparison with the spinal cord. Indeed, Epo-R/ $\beta c$  ratio was lower in the spinal cord than that measured in the hippocampus and the neocortex<sup>176</sup>. In the present study, we provide further evidence that the expression profile of  $\beta c$  does not correlate neither with that of Epo-R, nor with that of Epo in the neocortex, the hippocampus and the hypothalamus of the rat throughout lifespan. In addition, we report that PC12 cells, known to be protected by Epo in various noxious conditions<sup>129,255,285</sup>, do not express  $\beta c$  neither under proliferating conditions, as recently reported<sup>255</sup>, nor after NGF-induced neuronal differentiation, which is a condition that we show here to dramatically increase Epo-R gene expression.

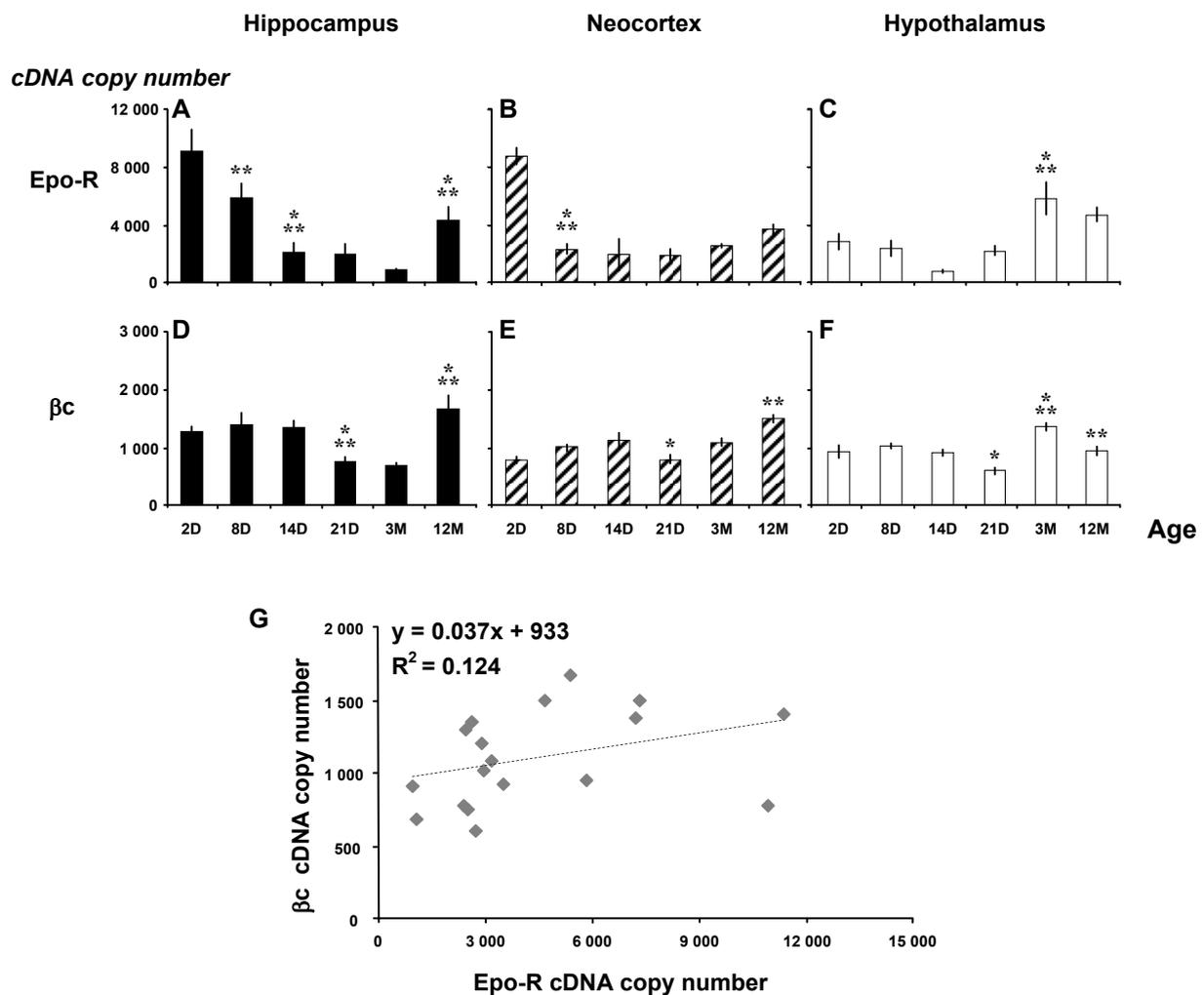
Double immunofluorescent labeling for  $\beta c$  and Epo-R was precluded using the primary antibodies selected. *In situ* immunolabelings of  $\beta c$  and Epo-R in adjacent sections indicate that rare neurons expressed  $\beta c$ , while a large

proportion of them expressed Epo-R. These results indicate that  $\beta c$  and Epo-R may colocalize in neurons, but in a few of them only within brain tissue. Nevertheless, we cannot totally exclude the possibility that very low levels of  $\beta c$  (below immunohistochemical detection limits) are sufficient to allow the formation of a sufficient number of  $\beta c$ /Epo-R receptor complexes to mediate neuronal response to Epo. However, considering that: i) rEpo protects extended populations of neurons

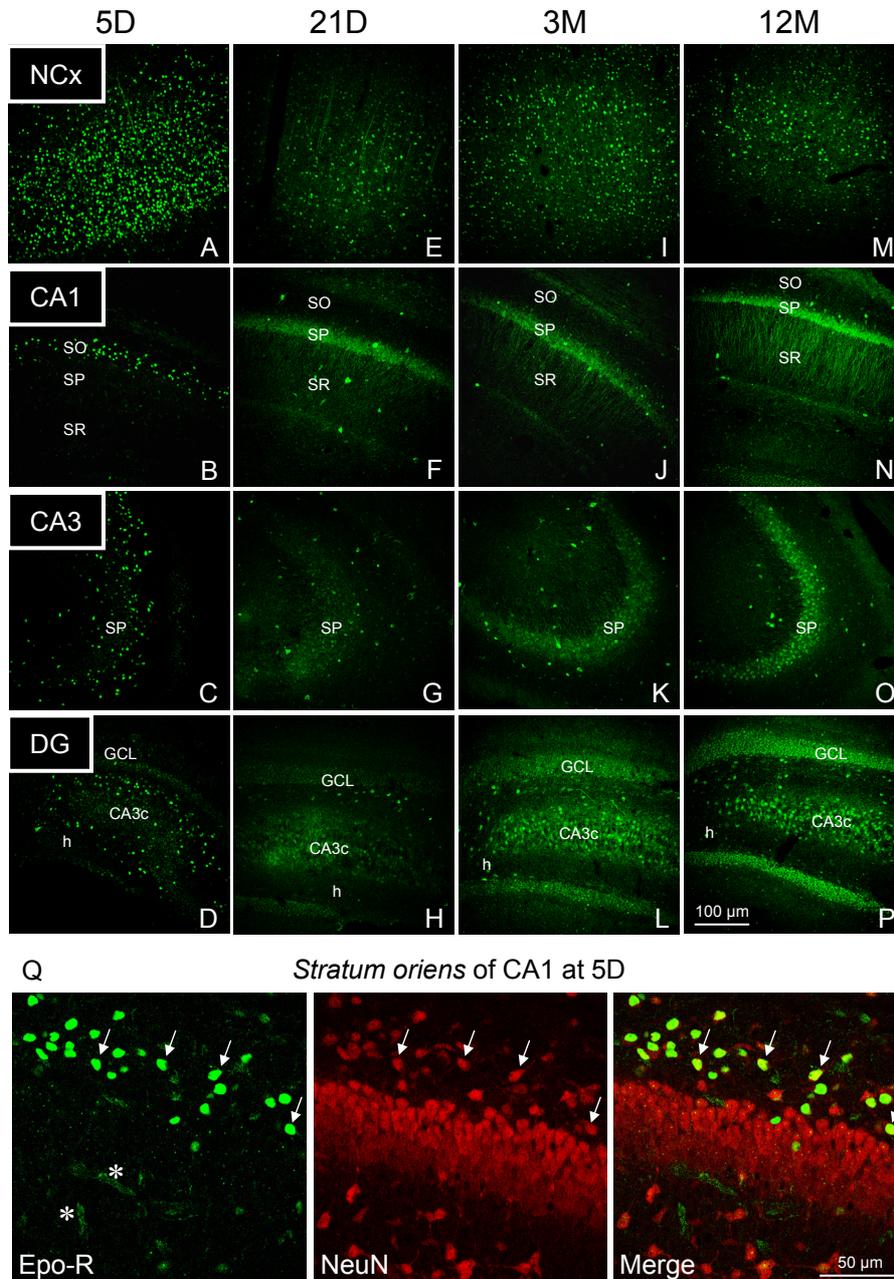
in models of brain injuries <sup>22,92,154</sup>, and ii) Epo exerts cytoprotective effects in cells that do not express  $\beta c$  <sup>255</sup>, a yet-to-be-identified receptor complex comprising Epo-R may exist in the large population of brain neurons that do not express  $\beta c$ . Research aimed at elucidating the identity of this receptor complex must be encouraged in particular to prevent misleading non erythropoietic analogues of Epo to be engineered.



**Fig. P1.1. Specificity of the antibody M-20 raised against Epo-R verified in fixed rat brain sections.** (A) Epo-R immunolabeling (green) in the hippocampus at 3M. (B) After pre-incubation of the antibody with a 5-fold excess of Epo-R blocking peptide, the green fluorescent signal completely disappears, as illustrated in area CA1 of the hippocampus at 3M. The blue fluorescent signal corresponds to DAPI nuclear staining in both images. Abbreviation: SR, *stratum radiatum*.

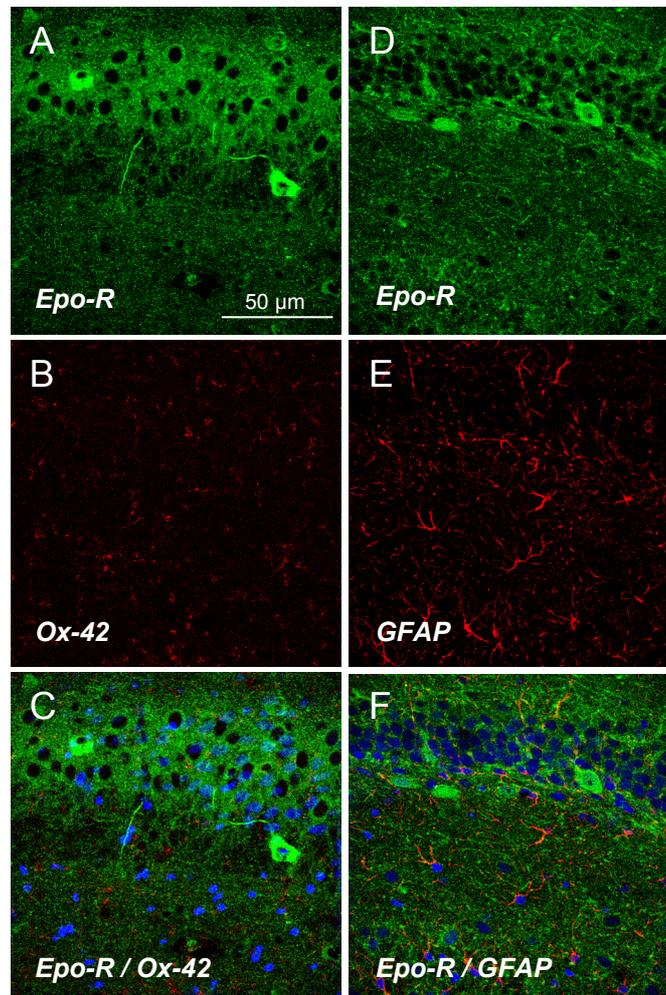


**Fig. P1.2. Expression profiles of Epo-R and  $\beta$ c transcripts in the hippocampus, the neocortex and the hypothalamus during postnatal development and ageing.** (A-F) Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM number of cDNA copies quantified by real time PCR following reverse transcription of mRNAs contained in 500 ng of total RNAs. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (Fisher LSD test following one-way ANOVA) as compared to the preceding age. (G)  $\beta$ c cDNA copy number was plotted against Epo-R cDNA copy number determined at each age in the three brain structures examined. Abbreviations: D, day; M, month.

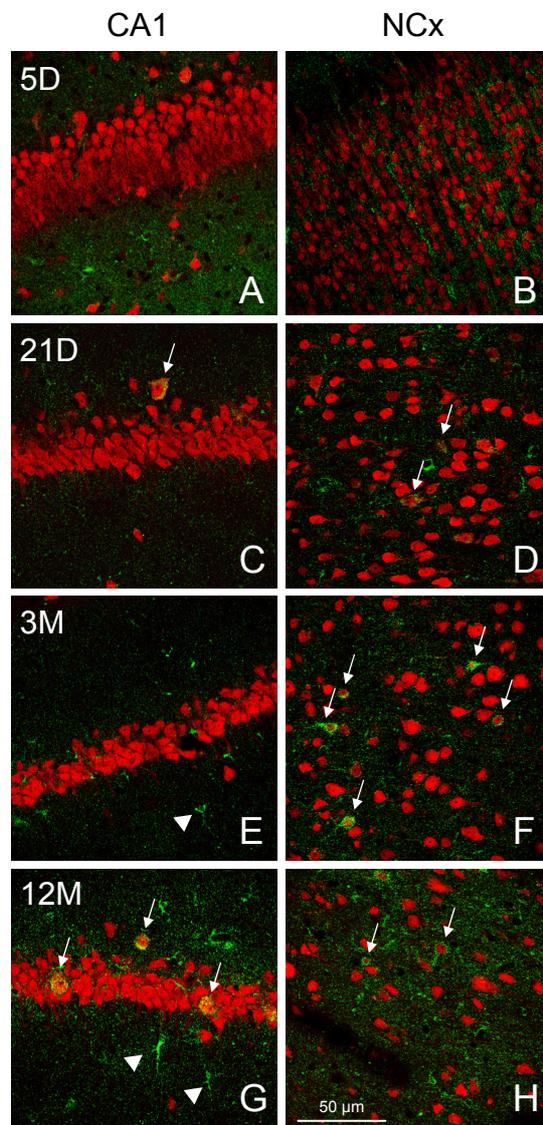


**Fig. P1.3. Distribution of Epo-R in cortical and hippocampal areas during postnatal development and ageing. A-P:** Pictures illustrate Epo-R detection in the neocortex, areas CA1 and CA3 and dentate gyrus of the hippocampus at 5D, 21D, 3M and 12M. **Q:** Phenotypic characterization of the round-shaped cells expressing high Epo-R immunofluorescent labeling in the *stratum oriens* of area CA1 at 5D. Epo-R (green) was detected in combination with NeuN (red). Some cells double-labeled with NeuN and Epo-R are indicated by white arrows. Stained microvessels are marked by asterisks. Abbreviations: D, day; DG, dentate gyrus; GCL, granule cell layer; h, hilus; M, month; NCx, neocortex; SO, *stratum oriens*; SP, *stratum pyramidale*; SR, *stratum radiatum*.

### 12 M - CA1

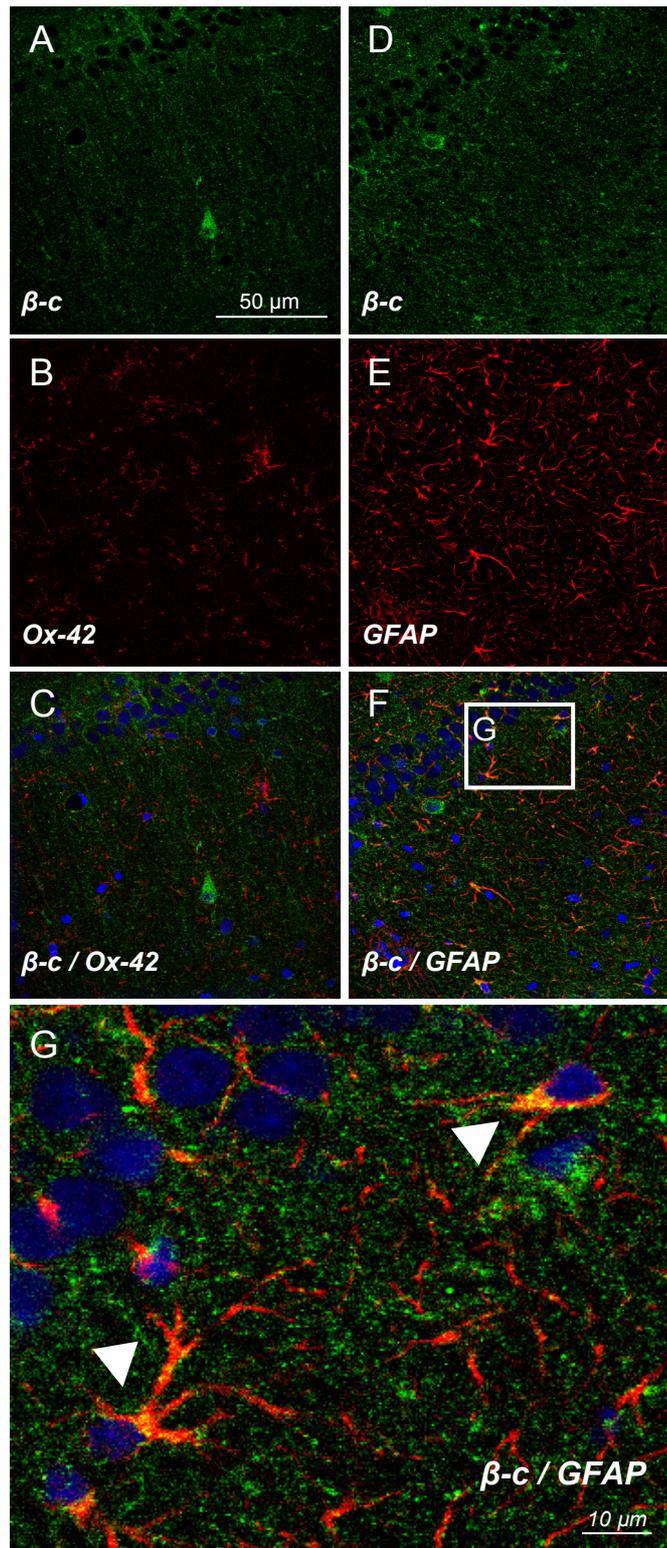


**Fig. P1.4. Dual immunofluorescent labelings of Epo-R (A, D) together with either the microglial marker Ox-42 (B) or the astroglial marker GFAP (E) in area CA1 at 3M.** Epo-R is detected neither in microglia, nor in astrocytes, as demonstrated on merged images (C and F, respectively).

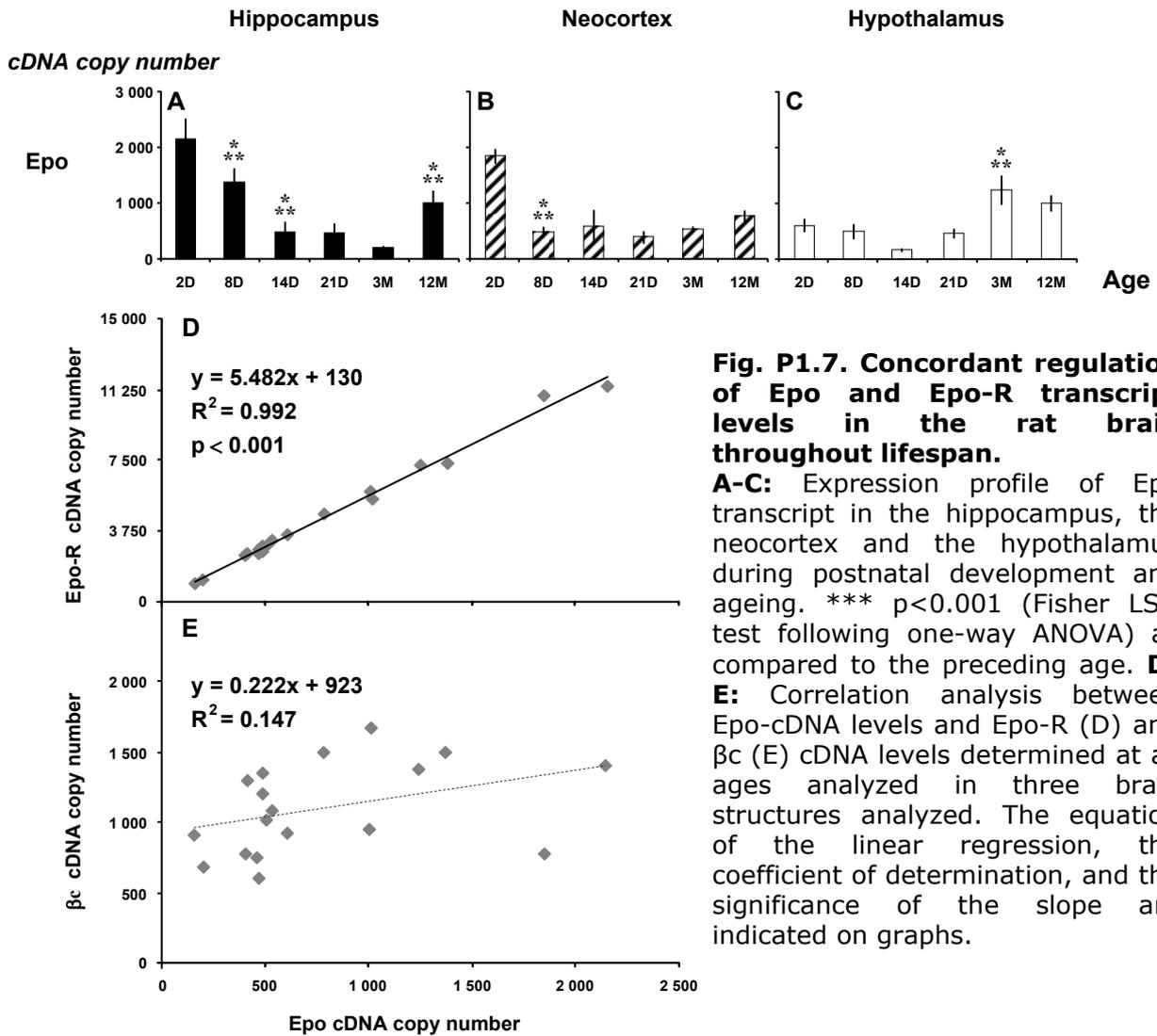


**Fig. P1.5. Dual immunolabelings of  $\beta$ c (green) and NeuN (red) in area CA1 and in the neocortex during postnatal development and ageing.** Neurons expressing  $\beta$ c are indicated by white arrows. To delete, and astrocytic processes by white arrowheads. Abbreviations: D, day; NCx, neocortex; M, month.

## 12 M - CA1

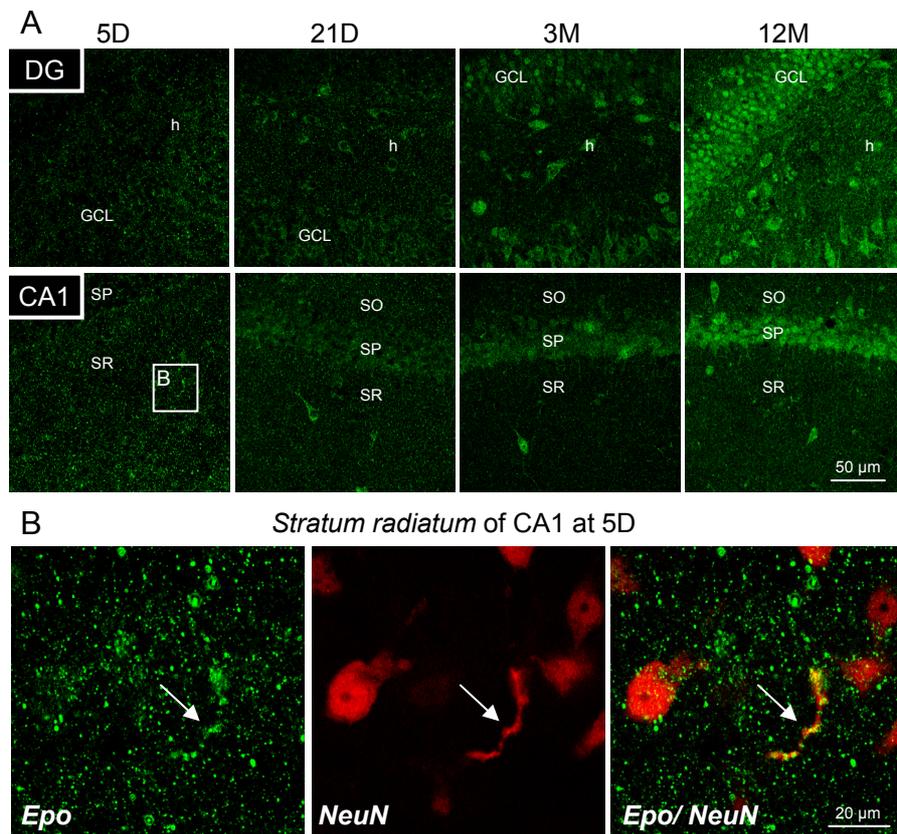


**Fig. P1.6.** Dual immunofluorescent labelings of  $\beta$ c (A, D) together with either the microglial marker Ox-42 (B) or the astroglial marker GFAP (E) in area CA1 at 12M.  $\beta$ c is not detected in microglia (merged image C). However, some astrocytes express  $\beta$ c above detection threshold, as illustrated on merged images at low and high magnifications (F and G, respectively). White arrowheads point out astrocytes expressing  $\beta$ c.



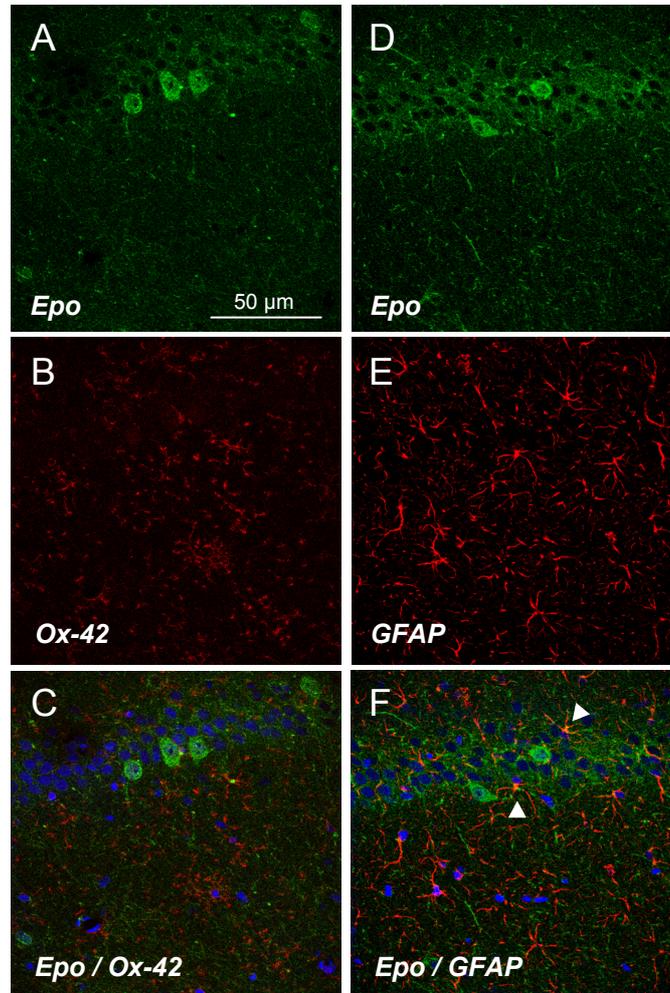
**Fig. P1.7. Concordant regulation of Epo and Epo-R transcript levels in the rat brain throughout lifespan.**

**A-C:** Expression profile of Epo transcript in the hippocampus, the neocortex and the hypothalamus during postnatal development and ageing. \*\*\*  $p < 0.001$  (Fisher LSD test following one-way ANOVA) as compared to the preceding age. **D-E:** Correlation analysis between Epo-cDNA levels and Epo-R (D) and  $\beta c$  (E) cDNA levels determined at all ages analyzed in three brain structures analyzed. The equation of the linear regression, the coefficient of determination, and the significance of the slope are indicated on graphs.

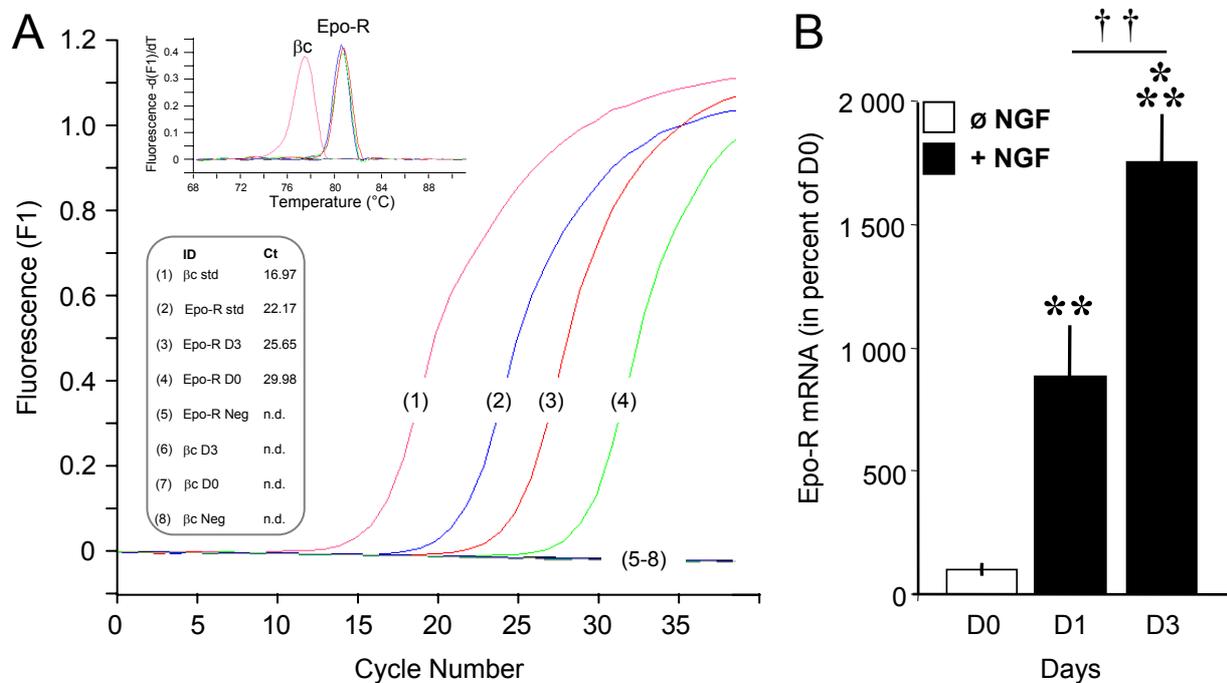


**Fig. P1.8. Immunolabeling of Epo in the hippocampus during postnatal development and ageing.** (A) Epo detection in the dentate gyrus and in area CA1. (B) Enlarged view indicated by the white box in the *stratum radiatum* of area CA1 at 5D illustrating a dendritic process (see white arrow) double immunolabeled with Epo and NeuN (neuronal marker). Abbreviations: D, day; DG, dentate gyrus; GCL, granule cell layer; h, hilus; M, month; SO, *stratum oriens*; SP, *stratum pyramidale*; SR, *stratum radiatum*.

### 12 M - CA1



**Fig. P1.9. Dual immunofluorescent labelings of Epo (A, D) together with either the microglial marker Ox-42 (B) or the astroglial marker GFAP (E) in area CA1 at 12M.** Epo is not detected in microglia (merged image C). However, scarce astrocytes express Epo above detection threshold as pointed out by the white arrowhead (merged image F).



**Fig. P1.10. Epo-R, but not  $\beta c$ , is expressed at transcript level in PC12 cells, before and after NGF-induced neuronal differentiation.** (A) Representative raw data obtained from real-time PCR amplifications of the cDNA of Epo-R and  $\beta c$ . The specificity of the amplification is indicated by the presence of a single peak for each amplicon on melting curves. Crossing threshold (Ct, in number of cycles) is provided for each of the following conditions: 1- standard for  $\beta c$  (500,000 copies before amplification); 2- standard for Epo-R (10,000 copies before amplification); 4, 7- undifferentiated PC12 cells; 3, 6- differentiated PC12 cells 3 days after NGF treatment (50 ng/mL); 5, 8- Negative controls (water). n.d.: not detected. (B) Variations in Epo-R transcript levels in undifferentiated PC12 cells (D0), and 1 (D1) and 3 (D3) days after NGF-induced neuronal differentiation. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , compared to D0; ††  $p < 0.01$ , D1 vs. D3.

## PAPIER N° 2

### Titre

**L'optimisation des effets neuroprotecteurs de l'érythropoïétine requière l'élévation de l'expression neuronale de son récepteur.**

### Etat

Soumis à PNAS.

### Résumé

L'Epo recombinante humaine (Eporh) protège le tissu cérébral des accidents cérébraux et des maladies neurodégénératives chez l'homme et chez l'animal. Cette molécule exerce ses effets neuroprotecteurs en se fixant sur son récepteur EpoR, essentiellement présent à la surface des neurones. Notre équipe a montré que l'expression de l'EpoR est hétérogène dans le cerveau (Nadam 2007). Ainsi, considérant que le niveau d'expression de l'EpoR détermine la capacité de réponse à l'Eporh, les populations neuronales qui présentent une expression faible d'EpoR, seraient moins susceptibles d'être protégées par un traitement à l'Eporh. Dans cette étude, nous montrons que l'expression constitutive de l'EpoR est plus importante dans l'hippocampe que dans la Région Ventrale Limbique (VLR, *pour Ventral Limbic Region*) (voir figure P2.1). Or, le traitement à l'Eporh à la suite du *Status Epilepticus* (SE) protège les neurones de l'hippocampe, mais pas ceux de la VLR. Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle le niveau d'expression de l'EpoR dans la VLR n'était pas suffisant pour répondre efficacement à l'Eporh.

Nos objectifs principaux étaient donc:

- ➔ De trouver des challenges physiologiques qui augmentent l'expression de l'EpoR dans le cerveau, et plus particulièrement dans la VLR.
- ➔ De savoir si une augmentation de l'EpoR dans la VLR était capable de potentialiser les effets neuroprotecteurs de l'Eporh dans cette région dans le modèle de SE.

Nous montrons que:

- *Trois séances d'hypoxie* modérée augmentent l'expression de l'ARNm de l'EpoR seulement dans la VLR dès la fin de la dernière hypoxie (voir figure P2.1), et se traduit 3 jours après par *une augmentation de la protéine EpoR dans les neurones* de cette même région (voir figure P2.1).
- L'hébergement des rats dans un environnement enrichi augmente l'expression de l'EpoR dans plusieurs structures cérébrales. En outre, lorsque les 3 hypoxies sont

réalisées sur les animaux hébergés en milieu enrichi, l'expression de l'EpoR cérébral devient optimal dans l'hippocampe dorsal et la VLR.

- *Lorsque l'induction de l'EpoR est provoquée (par les séances d'hypoxie) avant le SE, le traitement à l'Eporh protège efficacement les neurones de la VLR (voir figure P2.4). De plus, cette neuroprotection ne peut pas incombé aux effets de l'hypoxie puisque les 3 séances d'hypoxie ne permettent pas de protéger à elles seules les neurones de la VLR.*

Cette étude montre que l'expression cérébrale de l'EpoR est modulable en réponse à des manipulations environnementales non délétères. Nous démontrons ainsi que l'accumulation du récepteur cible de l'Epo dans les neurones de la VLR est un pré requis aux effets neuroprotecteurs du traitement à l'Eporh dans cette région particulièrement vulnérable. Cette découverte ouvre ainsi de nouvelles perspectives dans la recherche de stratégies neuroprotectrices. En plus de s'intéresser aux ligands potentiellement neuroprotecteur, il devient donc primordial de rechercher à augmenter les récepteurs cibles du ligand, soit par des challenges physiologiques, soit par l'administration de molécule.

**BIOLOGICAL SCIENCES****Optimized erythropoietin neuroprotective effect follows induced expression of its receptor in neurons**

Pascal E. Sanchez <sup>1-4</sup>†, Raafat P. Fares <sup>1-4</sup>†, Jean-Jacques Risso <sup>5</sup>, Sandrine Bouvard <sup>1,2,4</sup>, Marion Le-Cavorsin <sup>1-4</sup>, Béatrice Georges <sup>1-4</sup>, Colette Moulin <sup>1-4</sup>, Amor Belmeguenai <sup>1-4</sup>, Jacques Bodennec <sup>1-4</sup>, Anne Morales <sup>1-4</sup>, Jean-Marc Pequignot<sup>1-4</sup>, Etienne-Emile Baulieu <sup>6,7\*</sup>, Laurent Bezin<sup>1-4\*</sup>

1. University of Lyon, F-69003 Lyon, France;

2. University Lyon 1, F-69003 Lyon, France;

3. Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 5123, Integrative Cellular and Molecular Physiology Lab., 43 bd du 11 novembre 1918, F-69622 Villeurbanne cedex, France;

4. CTRS-IDEE and Hospices Civils de Lyon;

5. Institut de Médecine Navale du Service de Santé des Armées, BP 610, F-83800 Toulon Armées, France;

6. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 788, 80 rue du Général Leclerc, F-94276 Le Kremlin-Bicêtre cedex, France;

7. MAPREG Company, Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre, 78 rue du Général Leclerc, F-94276 Le Kremlin-Bicêtre cedex, France

† These authors contributed equally to the study.

\* Corresponding author.

**Keywords**

Hypoxia, environmental enrichment, epilepsy, neuroprotection, limbic system, enviromimetic.

**Acknowledgements**

This work was supported by grants from the CNRS and the Université Lyon 1. P.E. Sanchez is a fellow from the Délégation Générale pour l'Armement, Ministère français de la défense. We thank D. Ressenkoff, B. Smati and Y. Tourneur from the Centre Commun de Quantimétrie of the Université Lyon 1 for their assistance in the use of the confocal microscope.

**Author contribution:** P.E.S., R.P.F., J.M.P. and L.B. designed research, P.E.S., R.P.F., S.B., M.L.-C., B.G., and C.M. performed research, P.E.S., R.P.F., A.B., J.B., A.M., and L.B. analyzed data, P.E.S., R.P.F., J.J.R., E.-E.B., and L.B. wrote the paper.

**Corresponding author:**

Laurent Bezin

UMR5123- 43 bd du 11/11/1918 – F69622 Villeurbanne cedex – France

Tel: +33 472 445 841

Fax: +33 472 431 172

Laurent.bezin@univ-lyon1.fr

## ABSTRACT

Both endogenous erythropoietin (Epo) and exogenous recombinant human Epo (rhEpo) protect neurons from multiple damages by binding to Epo receptor (EpoR). Unfortunately, constitutive expression of EpoR is not uniform in the neuronal population of the central nervous system. Neuroprotective effect of rhEpo following excitotoxic injuries may thus be amplified by increasing neuronal expression of EpoR. We report that few neurons of the ventral limbic region (VLR) display detectable levels of EpoR under basal conditions. However, elevated EpoR expression can be extended to nearly all neurons when rats are subjected to 3 moderate hypoxic exposures at 4-day intervals (3H). The VLR is one of the most vulnerable brain area to excitotoxic damage such as occurring after pilocarpine-induced *status epilepticus* (Pilo-SE). We demonstrate that neuronal induction of EpoR must precede Pilo-SE to obtain a significant neuroprotective effect of rhEpo in the VLR. In addition, we show that EpoR induction can be achieved in the dorsal hippocampus (HiD) and the neocortex (NC) when 3H is applied to rats housed in enriched environments. Expanding our knowledge of the mechanisms by which diverse physiological conditions trigger the up-regulation of *EpoR* gene expression in neurons should lead to the development of drugs capable of elevating neuronal EpoR expression, which is a prerequisite to optimize neuroprotective effects of rhEpo following brain injuries.

## INTRODUCTION

Recombinant human erythropoietin (rhEpo) is now recognized as a promising molecule to prevent or protect against neurodegeneration

in a wide variety of experimental neurological disorders<sup>22,154,187</sup>. In addition, encouraging results on the neuroprotective efficacy of rhEpo in humans have been obtained from clinical trials involving stroke patients<sup>60</sup>, patients with chronic schizophrenia<sup>62</sup>, and patients with chronic progressive multiple sclerosis<sup>59</sup>.

The level of Epo receptor (EpoR) expression has been proposed to determine the cytoprotective effects of Epo in brain tissue<sup>33</sup>. *In vivo*, all neurons may not be prone to protective effects of Epo, based on our previous results showing that constitutive *EpoR* gene expression is heterogeneous in the rat central nervous system<sup>176</sup>. In addition, all brain areas do not exhibit the same neuronal vulnerability to excitotoxic injury; in comparison to the dorsal regions of the brain, the ventral limbic region (VLR) is subjected to intense neuronal death in response to a pilocarpine-induced *status epilepticus* (Pilo-SE)<sup>46</sup>. This study was thus aimed at finding physiological conditions making it possible to increase expression of EpoR in neurons of the VLR, in order to challenge the view that increased *EpoR* gene expression supports enhanced neuroprotective effects of rhEpo following Pilo-SE.

*In vitro* studies showed that hypoxic exposure increase *EpoR* gene expression in cultured neurons<sup>61,147,292</sup>. However, *in vivo*, a single hypoxic exposure failed to increase *EpoR* gene expression in the adult mouse brain<sup>17,234</sup>. We thus hypothesized that *EpoR* gene induction in neurons requires repetition of the hypoxic challenge.

Here, we firstly show that three hypoxic exposures significantly increase neuronal expression of EpoR, and secondly, demonstrate that EpoR induction is needed for rhEpo to counteract neurodegenerative processes following Pilo-SE in the VLR.

## RESULTS

**Constitutive expression of EpoR is low in VLR neurons.** *EpoR* gene is expressed at different levels in the adult rat hippocampus (Hi), neocortex (NC) and spinal cord<sup>176</sup>. Here, we have refined the analysis of *EpoR* gene expression by examining the VLR, which includes the insular agranular cortex (IAC), the amygdala (AMG) and the piriform cortex (PC). *EpoR* gene expression has been analyzed at both transcript and protein level, by targeting the full length-*EpoR* isoform involved in intracellular signaling<sup>146,216,286</sup>. Therefore, the PCR primers and the antibody used in this study are specific for the C-terminal cytoplasmic domain of *EpoR* cDNA and protein, respectively. We provide evidence that (i) *EpoR* transcript level in the VLR is lower than that measured in the dorsal hippocampus (HiD) (Fig. P2.1A), (ii) *EpoR* protein is detected with ease using colorimetric immunohistochemistry in the pyramidal layer of the PC, while it is expressed at a barely detectable level in the other areas of the VLR (Fig. P2.1B), and (iii) *EpoR* protein is exclusively detected in neurons using dual immunofluorescent labeling of *EpoR* with NeuN (Fig. P2.1B).

**Repeated hypoxic exposures activate neuronal expression of EpoR in the VLR.** In regard to the faint expression of *EpoR* in most of the neurons of the VLR, we explored the possibility to activate *EpoR* gene expression above detection threshold in these neurons. Hypoxia had already been shown to induce *EpoR* gene expression in cultured neurons<sup>37,61,147</sup>, but not *in vivo*. Here we show that a single hypoxic exposure (1H) has no effect on *EpoR* transcript level in HiD and the VLR immediately after hypoxia (Fig. P2.1A), and at all other time points tested: 1, 2 and 8 days

after reoxygenation (data not shown). However, by repeating three times the hypoxic exposures (3H) at 4-day intervals, we demonstrate for the first time a significant increase (+85%) in *EpoR* transcript level in the VLR, which was observed at the time of reoxygenation after the last hypoxic exposure (Fig. P2.1A), basal level being recovered 1 day later (data not shown). Increased *EpoR* transcript level was associated 3 days after 3H with an increased number of cells expressing *EpoR* protein above detection threshold, in the PC, the AMG and the IAC, and all *EpoR*-positive cells appeared to be neurons (Fig. P2.1B). Qualitative analysis of immunohistochemical detection of *EpoR* revealed that the number of cells detected 1 day after 3H was intermediate between the number determined in controls and the number obtained 3 days after 3H (data not shown). Quantitative analysis of *EpoR* immunofluorescent labeling over all NeuN-positive neurons revealed that: (i) a fluorescent labeling was detected in all neurons, the lowest values, ranging from 25 to 43 A.U, representing 5% of total neurons both in controls and after 3H, (ii) neurons with a concentration greater than 250 A.U. represented 11% of total neurons in controls and 48% after 3H, and (iii) the average cellular concentration of *EpoR* increased by 74% in VLR neurons after 3H (Fig. 1C).

**Hypoxia-induced expression of EpoR in VLR neurons is associated with the super-induction of Epo.** *In vivo*, a single hypoxic exposure (1H) is well-known to increase *Epo* gene expression in the brain of rodents<sup>219</sup>. Here we show that, after 1H, *Epo* transcript level was increased at the time of reoxygenation to a same extent in the two brain regions studied (HiD and VLR), and was further increased after 3H in the VLR only (Fig. P2.2A). After either 1 H or 3H, the apparent

peak of Epo mRNA was observed at the time of reoxygenation only, basal level being recovered 1 day later (data not shown).

The greater increase in Epo mRNA observed after 3H was associated, 3 days after reoxygenation, with an increased number of cells expressing Epo protein above detection threshold in the PC, the AMG and the IAC, and all Epo+ cells appeared to be neurons (Fig. P2.2B). As for EpoR protein, qualitative analysis of immunohistochemical detection of Epo revealed that the number of cells detected 1 day after 3H was intermediate between the number determined in controls and the number obtained 3 days after 3H (data not shown). Quantitative analysis of Epo immunofluorescent labeling over all NeuN-positive neurons revealed that: (i) 100% of VLR neurons expressed an Epo concentration greater than 100 A.U. after 3 H, compared to 26% only in controls, and (ii) the average cellular concentration of Epo increased by 349% in VLR neurons after 3H (Fig. P2.2C). Our results thus demonstrate that repeated hypoxic exposures elevate both *Epo* and *EpoR* gene expression in a substantial number of neurons in the VLR.

#### **Hypoxia-induced expression of EpoR is not associated with degenerative processes.**

Increased EpoR expression within the central nervous system was essentially reported in pathological conditions in humans<sup>9,58,63,227</sup>, or in contexts of neuronal suffering after severe damages in rodents<sup>18,85,157,176</sup>. Here, after 3H, we did not detect any degenerating neurons, either using Fluorojade B (FjB) staining performed 1 day (data not shown) and 3 days after reoxygenation (supplemental Fig. P2.6A), or using terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end-labeling of DNA breaks (supplemental Fig. P2.6B). These results indicate that induced expression of EpoR following repeated hypoxic exposures

was not consecutive to deleterious tissue events.

#### **Environmental enrichment extends hypoxia-induced *EpoR* gene expression beyond the VLR.**

Environmental enrichment (EE) refers to housing conditions with enhanced sensory, cognitive and motor stimulations. EE has a variety of effects on structural brain plasticity and behavior<sup>186,258</sup>. These effects are likely sustained by a wide modulation of gene expression pattern in the brain<sup>194</sup>. We report here for the first time that rearing in Marla<sup>TM</sup> enriched cages (EC) significantly increased EpoR transcript level in the dorsal (HiD) and ventral (HiV) parts of the hippocampus, and the VLR, compared to rearing in "standard" cages (SC) (Fig. P2.3A). Maximal EpoR transcript level in the NC, the HiD, and the VLR was reached in rats reared in EC and subjected to 3H (Fig. P2.3A). In the VLR, maximal level of EpoR transcript in the condition EC+3H was associated, 3 days after the last hypoxic exposure, to an increased number of cells detected for EpoR (Fig. P2.3B), that all appeared to be neurons (data not shown). In the HiV, the lowest EpoR transcript level was observed in rats raised in SC, and maximal level was attained in all other conditions (SC+3H, EC, EC+3H) (Fig. P2.3A). EE also increased Epo transcript level in the HiD, the HiV and the VLR (Fig. P2.3C), but did not modify the responsiveness to 3H compared to SC (Fig. P2.3D).

#### **Induced-*EpoR* gene expression in the VLR determines the neuroprotective effect of rhEpo after severe SE.**

High dose (5,000 IU/kg) of rhEpo (administered immediately, 1 day and 3 days after Pilo-SE), which is known to induce neuroprotective effects in the HiD<sup>176</sup> (supplemental Fig. P2.7), failed to protect neurons in the VLR (Fig. P2.4A-C). This lack of

rhEpo effect in the VLR cannot be attributed to a weak passage of rhEpo across the brain barriers, since parenchymal rhEpo concentration was greater in the VLR than in the HiD (Fig. P2.4D).

We then tested whether neuroprotective effects of rhEpo could be achieved in the VLR after 3H-induced neuronal expression of EpoR. We first noted that the way rats entered into sustained SE following pilocarpine administration was not altered by 3H: continuous convulsions were attained  $24.6 \pm 2.9$  min and  $21.6 \pm 1.0$  min after pilocarpine administration in control rats and in 3H-rats, respectively. We observed that rhEpo induced remarkable neuroprotective effects in the VLR of rats subjected to 3H (Fig. P2.4A-C). However, the intense induction in endogenous Epo measured after 3H (Fig. P2.2A) was not sufficient to protect vulnerable neurons in the VLR following Pilo-SE (Fig. P2.4A-C). Interestingly, in the HiD, where 3H did not induce *EpoR* gene expression, we observed identical neuroprotective effects of rhEpo between rats subjected or not to 3H, (supplemental Fig. P2.7), suggesting that lack of *EpoR* gene induction after 3H prevented rhEpo to exert enhanced neuroprotective effects.

#### **Repeated hypoxic exposures do not alter IGF-1, and Tpo/TpoR transcript levels in the VLR.**

Endogenous factors can either act in synergy with Epo, like Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)<sup>55</sup>, or interfere with Epo, like thrombopoietin (Tpo)<sup>61</sup>. Interestingly, hypoxia was shown to decrease Tpo and TpoR expression in cultured neurons at both transcript and protein level<sup>61</sup>. We expected that 3H would elevate the expression of IGF-1 and/or downregulate that of Tpo and its receptor TpoR. Instead, we show that neither IGF-1, nor Tpo and TpoR transcript levels were altered in response to 3H (Fig. P2.5).

## **DISCUSSION**

Beyond its role in hematopoiesis, rhEpo is one of the most promising neuroprotective agent currently available<sup>92,156</sup>. Our study provides evidence that *EpoR* gene expression is up-regulated in the adult rat brain under physiological conditions which are usually employed to decrease brain vulnerability. Such induction, occurring primarily in neurons, is required to promote neuroprotective effects of rhEpo. Our results emphasize that when testing the neuroprotective effects of a molecule, it is of importance to control the constitutive expression of the targeted receptor, and to seek conditions under which its expression can be optimized, in particular within the most vulnerable brain areas.

Here, we refined our previous findings<sup>176</sup> that not all areas similarly express *EpoR* gene, by showing that the level of EpoR is greater in the hippocampus than in the VLR. On the premise that tissue level of EpoR is a main factor determining tissue response to Epo<sup>33</sup>, our data indicate that not all brain areas similarly respond to rhEpo. Indeed, we show in the model of Pilo-SE, that rhEpo significantly protected hippocampal neurons from degeneration, but was inefficient to protect neurons of the VLR. This observation encouraged us to search for physiological conditions aimed at enhancing *EpoR* gene expression, especially within the VLR.

Induction of EpoR has been proposed as a tissue-protective response to injury<sup>85,154,176</sup>, and the only physiological response reported so far to enhance brain EpoR protein has been acclimation to ambient heat<sup>220</sup>. Sublethal exposures to extreme environmental conditions, known to increase brain tolerance to a subsequent damaging event<sup>79</sup>, may also

increase brain *EpoR* gene expression. Here, we show that non deleterious repetition of hypoxic exposures dramatically increases *EpoR* gene expression at both transcript and protein level, primarily in neurons of the VLR. We confirmed that *EpoR* gene expression remains unchanged in the brain of adult rodents after a single hypoxic exposure<sup>17,234</sup>. The fact that *EpoR* gene activation is dependent on the protocol of hypoxia has already been reported in the adult rat spleen<sup>216</sup>, and the reason why repetition of hypoxic exposures induces *EpoR* in the VLR is not known. We propose that the superinduction of *Epo*, occurring exclusively in the VLR after hypoxia repetition, may play a role, involving the transcription factor GATA-3, previously linked with induced *EpoR* transcript level in cultured neurons in an *Epo*-dependent fashion<sup>292</sup>. Intriguingly, we demonstrate for the first time that extreme environmental manipulations are not the only condition inducing *EpoR* gene expression in the brain. Indeed, environmental enrichment significantly elevated *EpoR* transcript level in the HiD and the VLR, and rendered dorsal brain areas (HiD and NCx) sensitive to repeated hypoxia. By contrast, maximal *EpoR* gene expression in the ventral brain areas (HiV and VLR) was attained after repeated hypoxia exposures, independently of whether rats were raised in standard or enriched housing conditions.

In line with the notion that enhanced *EpoR* gene expression confers increased tissue response to rhEpo, we ascertain that rhEpo protect VLR neurons following excitotoxic injury in rats subjected to repeated hypoxic exposures only. This effect is mainly explained by the increased expression of *EpoR* gene in VLR neurons, since neither rhEpo nor repeated hypoxic exposures were sufficient to induce neuroprotective effects. In addition, this effect is very likely independent of other adaptative

mechanisms activated (or repressed) by the repetition of hypoxic exposures, since: (i) in the dorsal hippocampus of rats subjected to 3H which showed no induction of *EpoR*, rhEpo had no additional protective effects, (ii) the expression of IGF-1, known to potentiate rhEpo effects *in vitro*<sup>55</sup>, and the expression of Tpo/TpoR, known to interfere with rhEpo effects<sup>61</sup>, were not altered by 3H. Altogether, our results indicate that induction of *EpoR* gene expression in vulnerable brain areas by 3H is a prerequisite to optimize neuroprotective effects of rhEpo. Unfortunately, this concept could not be tested in the dorsal hippocampus, which *EpoR* gene expression is enhanced in rats raised in EE and subjected to 3H, due to the inhibitory effect of EE on the development of brain excitability and SE<sup>10,290</sup>.

*Epo*, which is a molecule induced by hypoxia, is considered to play a key role in the enhancement of brain robustness by hypoxia<sup>219</sup>. Hence, rhEpo can be considered as an 'enviromimetic', defined as any exogenous molecule that mimics the beneficial effects of environmental manipulation<sup>186</sup>. Here we show that repeated hypoxic exposures, that rendered rhEpo effective in the VLR, induced *EpoR*. These results are in line with the concept that optimization of the effect of neuroprotective agent may require the preliminary induction of its targeted receptor<sup>145</sup>. Concerning rhEpo, future studies should elucidate, in complement to be better understanding of the mechanisms promoting trafficking of *EpoR* toward the cell surface<sup>197</sup>, the mechanisms selectively involved in the induction of *EpoR* after environmental manipulations, in order to develop drugs capable of inducing *EpoR*.

## MATERIALS AND METHODS

**Animals.** All animal experiments were in compliance with the guidelines of the European Union (directive 86/609), taken into the French law (decree 87/848), regulating animal experimentation. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Sprague-Dawley male rats (Harlan, France) were used throughout the study. For more detailed information see *supporting materials and methods*.

**Hypoxic exposure.** Hypoxia was realized by introducing rats within a chamber (Biospherix), the oxygen (O<sub>2</sub>) proportion of which decreased progressively from 21% to 8% in 1h. Each hypoxia exposure was maintained at 8% O<sub>2</sub> during 6h. O<sub>2</sub> proportion was automatically regulated by the Pro-Ox system (Biospherix). The 3 hypoxia exposures were carried out 4 days apart.

**Environmental enrichment.** We engineered a cage (MARLAU™) promoting standardization of the procedures of enrichment. This cage (supplemental Fig. 8) allows increased social interactions (12 rats per cage), increased voluntary exercise (large surface area and presence of 3 running wheels), "diverting" activities (red tunnel, ladder, toboggan slide), and cognitive stimulations using labyrinths, the configuration of which is changed 3 times a week. S rats were housed in groups of 6 from weaning to adulthood.

**Pilo-SE.** Details have been published earlier<sup>169,176</sup>. Briefly, scopolamine methylnitrate (1 mg/kg, s.c.; Sigma) was administered 30 min prior to pilocarpine hydrochloride (350 mg/kg, i.p.; Sigma). SE was stopped 2 h after its onset by i.p. injection of 20 mg/kg diazepam (Valium®, Roche).

### **Ex vivo procedures**

All rats were deeply anesthetized with a lethal dose of pentobarbital (250 mg/kg) before being sacrificed. For biochemical analysis, brain structures were rapidly microdissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For immunohistochemistry analysis, animals were transcardially perfused with chilled 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer. After cryoprotection in 25% sucrose, brains were frozen at -40°C in isopentane and stored at -80°C. For Elisa measurement, rats were intracardially perfused for 2 min with chilled 0.9% NaCl. After brain removal, the VLR was dissected, weighted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C.

**Reverse Transcriptase real time Polymerase Chain Reaction (RT-real time PCR).** Variations in transcript levels were determined by real time PCR amplification of cDNAs of interest after reverse transcription (RT) of total mRNAs, as previously detailed<sup>176</sup>. For more detailed information on primers used for PCR, see *supporting materials and methods*.

**Quantitative determination of rhEpo using Elisa.** RhEpo was measured using an Elisa kit (R&D Systems), as previously described<sup>176</sup>.

**Immunohistochemistry.** Free floating sections of fixed tissue were used for colorimetric or fluorescent labelling of Epo and EpoR, in combination or not with either labeling of NeuN or GFAP. Images were captured by a TCS SP2 confocal microscopy system (Leica). For more detailed information see *supporting materials and methods*.

**Labeling of neuronal degeneration.** Fluoro-Jade B (Chemicon) was used to identify degenerating neurons after Pilo-SE in rats<sup>212</sup>.

Cell death occurring with DNA breaks was detected using terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick end-labeling of DNA breaks (Roche).

**Image analysis.** Measurements of (i) neuronal density and (ii) fluorescent intensity were performed using an image analysis system (Visilog, Noesis). For more detailed information see *supporting materials and methods*.

**Statistical analysis.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of the different variables analyzed (mRNA level, neuronal density, brain uptake of rhEpo) and were compared among groups by using one- or two-way ANOVA followed by Fisher's protected Least Significance Differences (LSD) test.

## SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

### **In vivo experimental design**

**Animals.** Male Sprague-Dawley rats (Harlan, Gannat, France) were used throughout the experiments. They arrived at 5 weeks old (experiments, 1, 3 and 4) or at 2 weeks old with a dam (experiment 2) in approved facilities, and housed at 21°C under diurnal lighting conditions (lights on from 06:00 am to 06:00 pm). They were maintained in groups of 6 in plastic cages (type "E" cages, Charles River, France) with free access to food and water. After 2 weeks acclimatization, rats underwent 3 weeks of experimental procedure. Following Pilo-SE, rats were housed individually to support recovery until being sacrificed. Control rats were housed in groups of 6 throughout all the experiment to avoid deleterious effects related to stress isolation. Control rats received

systematically corresponding injections of saline solution.

**Experiment 1.** Brain expression of *Epo* and *EpoR* genes was determined in the Hi and the VLR of control rats (n=10) and rats subjected to either 1 (n=13) or 3 (n=22) hypoxic (H) exposure(s). Expression profiles of *Epo* and *EpoR* mRNAs were measured by RT-real time PCR (RT-qPCR) in control rats (n=6) and at various re-oxygenation times following either 1H (0h, n=4, 1 day, n=3; 2 days, n=3; 8 days, n=3) or 3H (0h, n=4; 1 day, n=4; 2 days, n=4; 8 days, n=4). In addition, immunostaining on brain sections of *Epo* and *EpoR* was realized in combination or not with neuronal (NeuN) and astrocytic (GFAP) markers at 1 (n=3) and 3 (n=3) days following 3H (n=6). Degenerative processes were also assessed after reoxygenation in all groups. Control rats (n=4) were included in this analysis.

**Experiment 2.** Rats were housed in MARLAU™ enriched cages (EC), developed in our group to standardize environmental enrichment (EE), or two standard cages (SC, type "E", Charles River, France). Six and twelve rats were grouped together in SC and EC, respectively, from weaning until completion of the experiment. For more detailed information see *supporting materials and methods*. Six weeks after weaning, half of the rats of each SC and EC conditions (6/12 rats in each condition) were subjected to 3 hypoxic exposures. Levels of *EpoR* and *Epo* transcripts were measured by RT-qPCR in the HiD, the HiV, the NC and the VLR of 4 rats in each group. The remaining rats (n=2 per group) were used for *EpoR* immunostaining.

**Experiment 3.** To determine whether 3 hypoxic exposures could enhance rhEpo neuroprotective effects after Pilo-SE, rats were subjected to 3H (n=12) or not (n=12) prior to Pilo-SE. In each group, half of the rats that underwent Pilo-SE were treated or not with rhEpo (Eprex®, generously provided by Janssen-Cilag) at 5,000 IU/kg i.p. immediately after cessation of SE, and then 1 day and 3 days later. This dose of rhEpo corresponds to the optimal neuroprotective dose with this route of administration<sup>27</sup>. Neuronal protection was evaluated 6 days after Pilo-SE by measuring the density of NeuN+ cells in the VLR. Control rats (n=6) received the same injections as rats subjected to SE, except that saline was substituted for pilocarpine.

**Experiment 4.** Tissue concentration of rhEpo in the VLR and the HiD was determined at different times (1 h and 4 h) following its peripheral administration in control rats (n=6) and in rats subjected to Pilo-SE (n=6). In these latter, rhEpo was administered just after cessation of SE.

## Methods

**RT-qPCR.** Sequences of the different primer pairs used are: **Epo** (GenBank NM\_017001) forward 5' GCT CCA ATC TTT GTG GCA TC 3', reverse 5' ATC CAT GTC TTG CCC CCT A 3' (66 bp); **EpoR** (GenBank D13566) forward 5' CCA GCT CTA AGC TCC TGT GC 3', reverse 5' CTT CAG GTG AGG TGG AGT GG 3' (68 bp), **IGF-1** (GenBank NM\_178866.2) forward 5' ATG CCC AAG ACT CAG AAG GA 3', reverse 5' CGT GGC ATT TTC TGT TTC TC 3' (110 bp), **Tpo** (GenBank D32207) forward 5' CCC AAG CAG AAC CTC TCA AC 3', reverse 5' TCA GGT ATC CAG GGA TTT GG 3' (200 bp), **TpoR**<sup>61</sup> forward 5' AGA ACC CAC AGA GTG GTG TG 3', reverse 5' TCA CAC CAT CCA GGA GCA AGA AT 3' (220

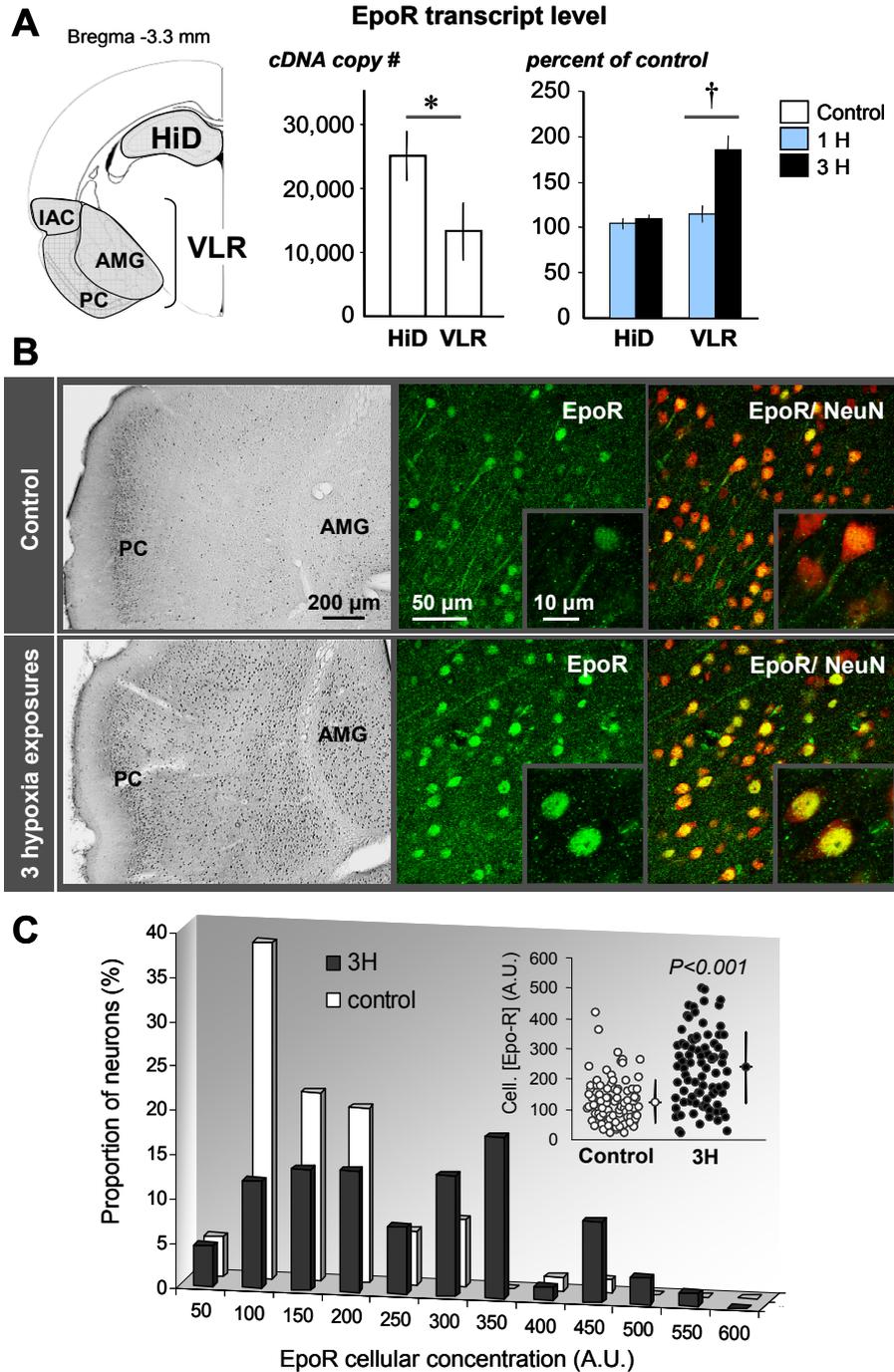
bp). All primer pairs were designed using "Primer 3" software (NIH; [www.basic.nwu.edu](http://www.basic.nwu.edu)).

**Immunohistochemistry.** Free floating sections (40 µm thick) from paraformaldehyde-fixed tissue were incubated either with a rabbit polyclonal anti-Epo antibody (sc-7956; Santa Cruz), or with a rabbit polyclonal anti-EpoR antibody (sc-697; Santa Cruz), or with a mouse monoclonal anti-NeuN antibody (MAB-377; Chemicon) or a GFAP antibody (G3893; Sigma). For colorimetric immunolabeling, sections were then incubated with a biotinylated donkey antibody raised against mouse IgG (715-065-151; Jackson ImmunoResearch). Sections were incubated with avidin biotin peroxidase (1:500; Vectastain Elite ABC kit, Vector) and reacted with 0.4 mM 3',3'-diaminobenzidine (DAB, Vector). For fluorescent dual-immunolabeling, sections were exposed to an Alexa-488-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody (A-21206; Molecular Probes) and to an Alexa-633-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (A21052; Molecular Probes). Sections were then mounted on Superfrost®Plus slides and coverglassed with Prolong Gold Antifade reagent (Molecular Probes). Images were captured by a TCS SP2 confocal microscopy system (Leica). Images were then imported into Adobe Photoshop 8.0.1 (Adobe Systems) for further editing.

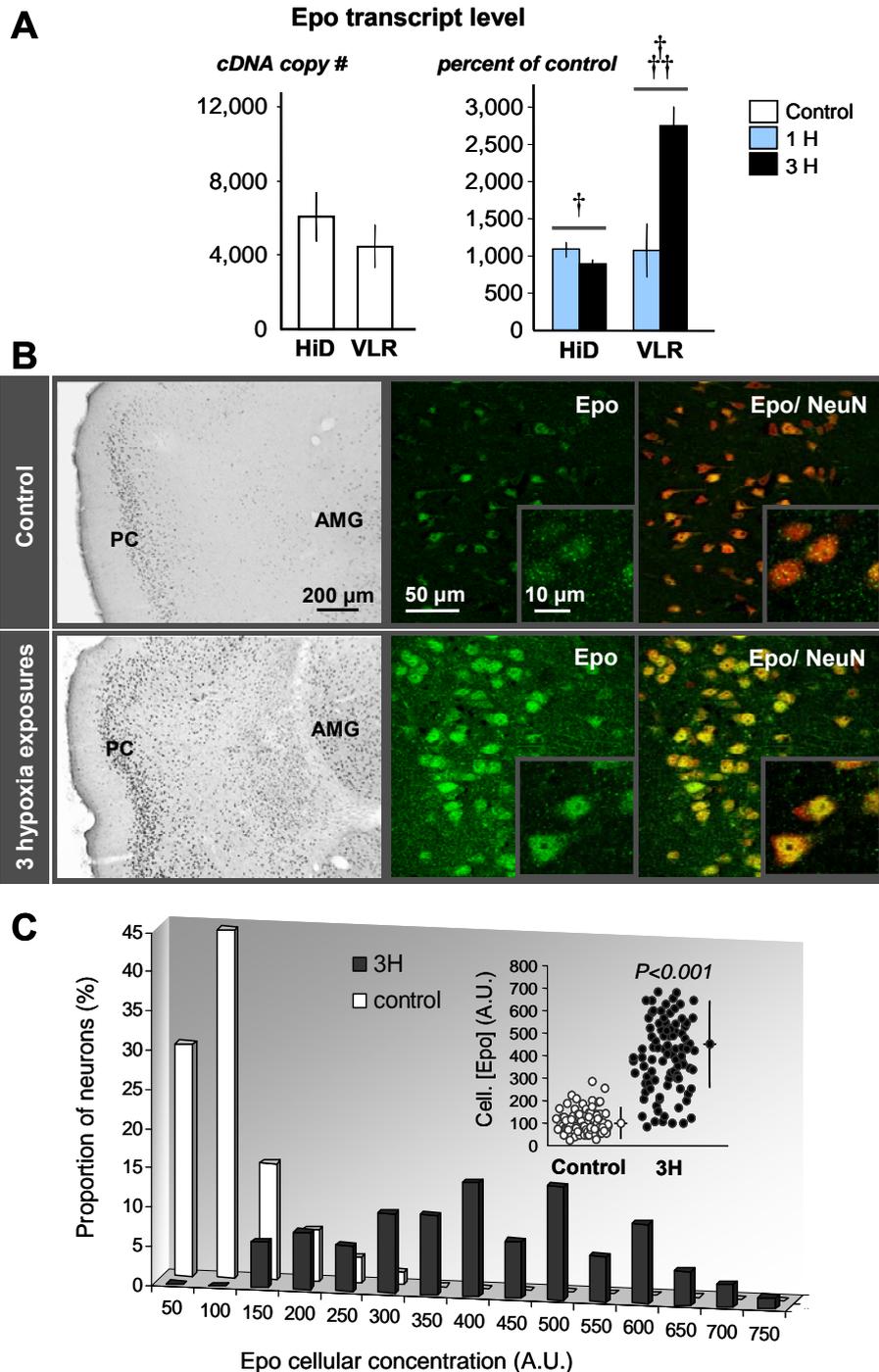
**Neuronal density measurement.** Sections immunostained with NeuN were observed under a light microscope (Diaplan; Leitz), and images were captured with a video camera 3CCD (DXC-930P; Sony) coupled to an image analysis system (Visilog® 6.3; Noesis). The system allows to scan at magnification 10X adjacent fields throughout the whole ventral region and to reconstruct a single image

composed of a mosaic of the digitized adjacent fields. Mosaics of the ventral region, composed by the amygdala, the piriform cortex and the insular agranular cortex were captured at both interaural +6.44 mm and +5.40 mm. To obtain an index of the neuronal density, the surface area occupied by NeuN+ cells within the VLR or within areas CA1 and CA3 of the HiD was divided by the total surface area.

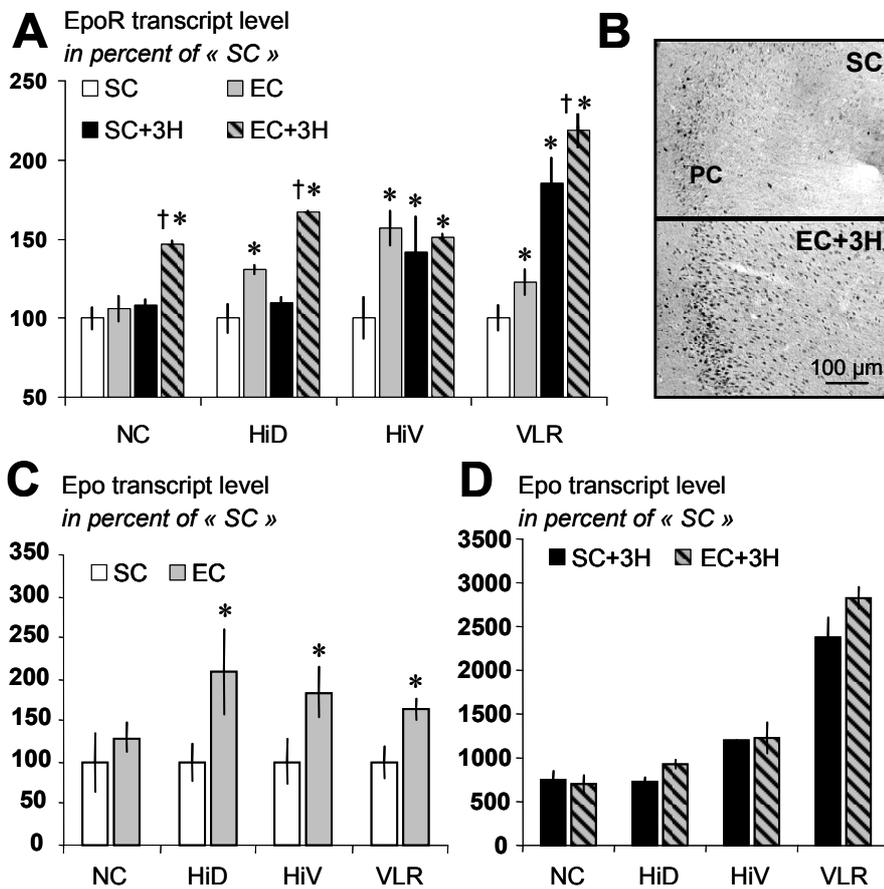
**Measurement of the intensity of Epo- or EpoR-immunofluorescent labeling in neurons.** Sections used were all processed together for the dual immunofluorescent labeling of Epo or EpoR with NeuN. They were then analyzed at the same conditions of photomultiplier gain, offset and pinhole aperture using a TCS SP2 confocal microscopy system (Leica), allowing the comparison of fluorescence intensity in all neurons contained in the image using an image analysis system (Visilog 6.3, Noesis).



**Figure P2.1. Repetition of hypoxia exposures activates *EpoR* gene expression in the VLR.** (A) *EpoR* transcript level measured by RT-qPCR in the HiD and the VLR of control rats revealed that *EpoR*-mRNA level was lower in the VLR than that measured in the HiD (\*  $P < 0.05$ ). When measured at re-oxygenation time in rats subjected to either 1 (1H) or 3 (3H) hypoxic episodes, a significant increase in *EpoR*-mRNA level was found in the VLR after 3H only (†  $P < 0.05$  compared to 1H). All bars represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$  in each group). (B) Three days after re-oxygenation time in rats subjected to 3H, the number of cells detected for *EpoR* remarkably increased compared to controls as shown after colorimetric detection; all *EpoR*-detected cells appeared to be neurons (NeuN+), as illustrated in the IAC: *EpoR* is in green and NeuN in red. (C) In the IAC, the increased number of cells detected after 3H was associated with an increased intensity of *EpoR*-immunofluorescent labeling (in A.U.), considered as the *EpoR* cellular concentration ( $n = 132$  neurons in controls,  $n = 130$  neurons after 3H). Graph in the panel represents all neurons measured and the mean  $\pm$  SD for each group. Abbreviations: AMG, amygdala; HiD, dorsal hippocampus; IAC, insular agranular cortex; PC, piriform cortex; VLR, ventral limbic region.

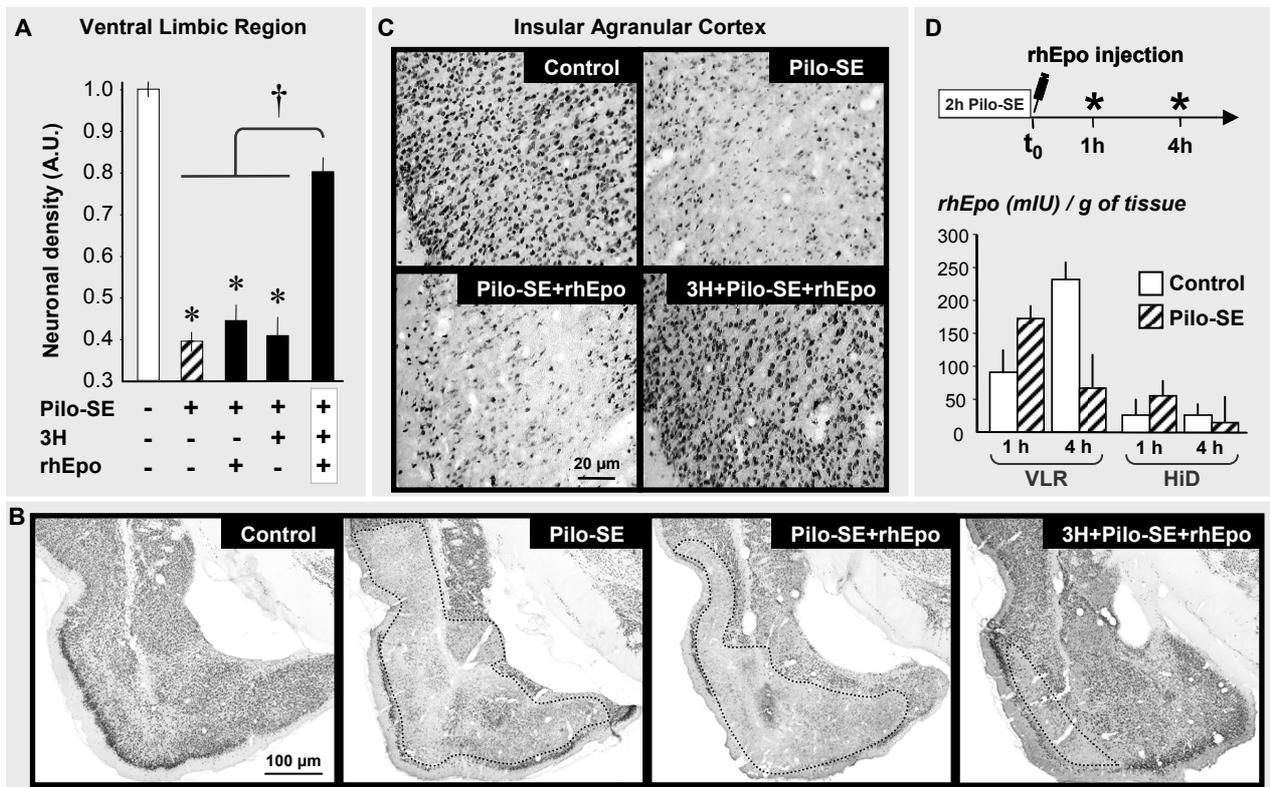


**Figure P2.2. Repetition of hypoxia exposures superinduces *Epo* gene expression in the VLR.** (A) Constitutive level of *Epo* transcript measured by RT-qPCR was similar in the HiD and the VLR. At re-oxygenation time after 1H, *Epo*-mRNA level was significantly increased to the same extent in the three brain areas ( $P < 0.001$  between control and 1H). However, at re-oxygenation time after 3H, *Epo*-mRNA level was superinduced in the VLR only ( $\dagger P < 0.05$ ,  $\dagger\dagger\dagger P < 0.001$  between 1H and 3H). All bars represent mean  $\pm$  SEM ( $n = 4$  in each group). (B) Three days after re-oxygenation time in rats subjected to 3H, the number of cells detected for *Epo* remarkably increased compared to controls, as shown after colorimetric detection; all *Epo*-detected cells appeared to be neurons (NeuN+), as illustrated in the IAC: *Epo* is in green and NeuN in red. (C) In the IAC, the increased number of detected cells after 3H was associated with an increased intensity of *Epo*-immunofluorescent labeling (in A.U.), considered as the *Epo* cellular concentration ( $n = 141$  neurons in controls,  $n = 153$  neurons after 3H). Graph in the panel represents all neurons measured and the mean  $\pm$  SD for each group. Abbreviations: as in Figure P2.1.

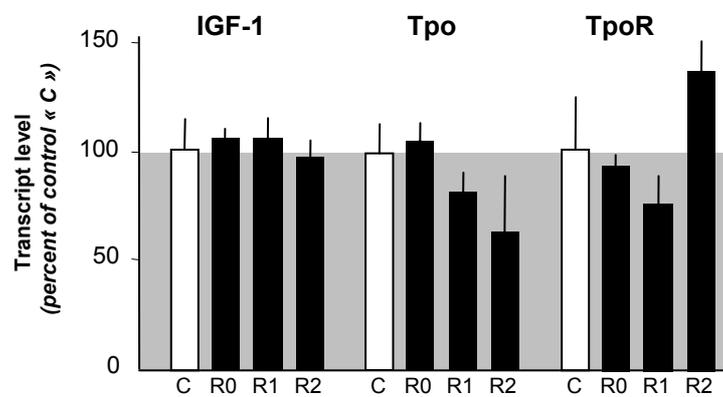


**Figure P2.3. Environmental enrichment increases brain *EpoR* and *Epo* gene expression.** (A) Level of Epo-R transcript was measured in the NC, the HiD, the HiV and the VLR of rats raised in standard cages (SC) or enriched cages (EC), and subjected or not to 3H. In 3H groups, tissues were collected at re-oxygenation time of the last hypoxic exposure (\*  $P < 0.01$  compared to SC, †  $P < 0.01$  compared to EC). (B) Three days after re-oxygenation time in rats subjected to EC+3H, the number of cells detected for EpoR increased compared to controls. (C) Constitutive expression of Epo was increased in the HiD, the HiV and the VLR in rats raised in EC compared to SC (\*  $P < 0.05$ ). (D) Brain reactivity of *Epo* gene expression to 3H, measured at transcript level, was not affected by housing conditions. All bars represent mean  $\pm$  SEM ( $n=4$  in each group). Abbreviations: as in Figure P2.1; HiV, ventral hippocampus.

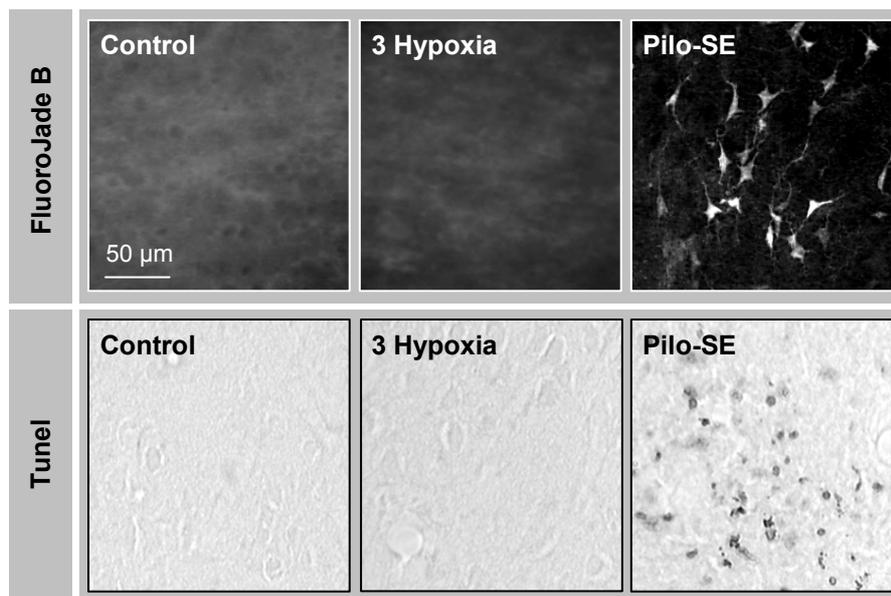
Figure 3



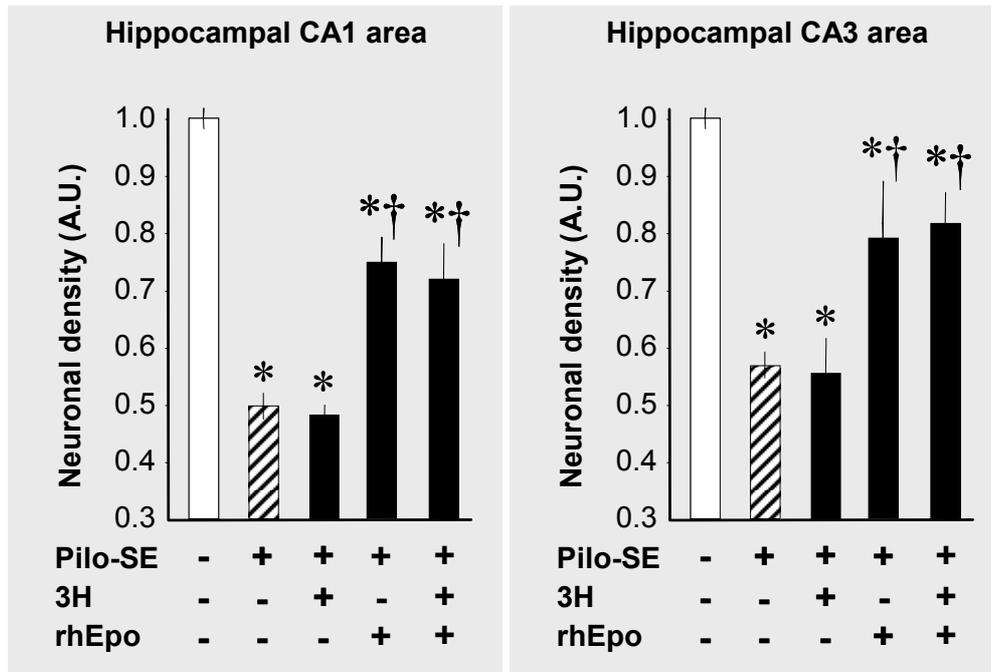
**Figure P2.4. Neuroprotective effects of rhEpo in the VLR are only observed in rats subjected to 3H following Pilo-SE.** **(A)** Neuronal density in the VLR was measured at anatomical planes corresponding to IA +6.44 mm and + 5.40 mm according to (Paxinos and Watson, 1998). Because the anatomical plane itself had no effect, and no significant interaction was found between “anatomical plane” and “treatment condition”, results for neuronal density were collapsed over the “anatomical plane” factor. Neither 3H alone, nor rhEpo alone, induced neuroprotective effects in the VLR after Pilo-SE. However, rhEpo administered in rats subjected to 3H significantly protected VLR neurons against neurodegeneration after Pilo-SE. \*  $P < 0.001$  compared to controls, †  $P < 0.05$  ( $n = 6$  in each group). **(B)** Immunohistochemical detection of NeuN six days after Pilo-SE in the IAC and the AMG: rhEpo had neuroprotective effects only when rats were subjected to 3H prior to Pilo-SE. **(C)** Parenchymal uptake of rhEpo was greater in the VLR than that measured in the HiD ( $P < 0.001$ , ANOVA 2 in both control and Pilo-SE groups; factor 1 is “brain area”, factor 2 is “time after rhEpo injection”), both in controls and in rats subjected to Pilo-SE. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  in each group). \*: time of termination.



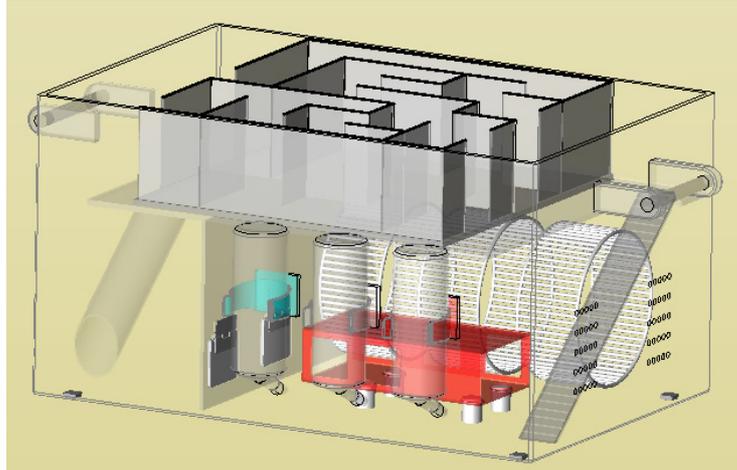
**Figure P2.5. Repetition of hypoxia exposures does not alter IGF-1, Tpo and TpoR transcript levels in the VLR.** Controls and rats subjected to 3H were sacrificed immediately after (R0), 1 (R1) and 2 (R2) days after the last hypoxic exposure. Levels of transcripts were measured by RT-qPCR. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM ( $n=4$  in each group).



**Supplemental Figure P2.6. Repetition of hypoxia exposures does not induce detectable degenerative processes.** Fluorojade B staining or Tunel were used to detect neurodegeneration or cell death associated with DNA breaks, respectively. No signal was obtained in controls and 3H rats with both methods, as shown here in the dorsal hippocampus three days after reoxygenation. By contrast, both Fluorojade B and Tunel+ cells were detected in the hippocampus 24h after Pilo-SE.



**Supplemental Figure P2.7. Neuroprotective effects of rhEpo in the dorsal hippocampus six days after Pilo-SE.** Neuronal density in CA1 and CA3 areas was measured at anatomical planes corresponding to IA +6.44 mm and + 5.40 mm according to (Paxinos and Watson, 1998). Because the anatomical plane itself had no effect, and no significant interaction was found between “anatomical plane” and “treatment condition”, results for neuronal density were collapsed over the “anatomical plane” factor. 3H alone did not induce any neuroprotective effects in the two hippocampal areas after Pilo-SE. By contrast, rhEpo administered alone or in rats subjected to 3H significantly protected pyramidal neurons of CA1 and CA3 areas against neurodegeneration after Pilo-SE. However, no greater neuroprotective effect of rhEpo was observed in rats subjected to 3H. \*  $P < 0.001$  compared to controls, †  $P < 0.001$  compared to “Pilo-SE” or “Pilo-SE + 3H” ( $n=6$  in each group).



**Supplemental Figure P2.8. Marlau™: a new cage to calibrate environmental enrichment in rodents.** This cage allows increased social interactions (12 rats per cage), increased voluntary exercise (large surface area and presence of 3 running wheels), "diverting" activities (red tunnel, ladder, toboggan slide), and cognitive stimulations using labyrinths, the configuration of which is changed 3 times a week.

## PAPIER N° 3

### Titre

**Mécanismes moléculaires et cellulaires de la neuroprotection par l'érythropoïétine au cours de l'épileptogénèse.**

### Etat

En préparation.

### Résumé

Aujourd'hui, nos connaissances sur les mécanismes par lesquels l'EpoRH protège le tissu cérébral restent encore très pauvres. Dans le papier n°2, nous montrons dans un modèle de *Status Epilepticus* (SE) chez le rat adulte, que les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH sont améliorés lorsque l'expression neuronale de son récepteur cible est préalablement augmentée par trois expositions hypoxiques. Ces résultats suggèrent que l'EpoRH ait exercé ses effets neuroprotecteurs en ciblant directement les neurones. En effet, en se fixant sur son récepteur, l'EpoRH déclenche des voies de signalisation intracellulaires favorisant la survie neuronale (voir le paragraphe VI-1 de l'Etat de l'Art). En outre, étant donné que les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH sont associés à une réduction de la réponse inflammatoire du SNC dans plusieurs modèles d'atteinte cérébrale, il a été suggéré que l'EpoRH puisse aussi exercer des effets anti-inflammatoires (voir le paragraphe VI-2 de l'Etat de l'Art). Dans notre modèle de SE, nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH passeraient non seulement par une action directe sur les neurones, mais aussi par une régulation de la réponse inflammatoire précoce.

Nos objectifs principaux étaient donc:

- ➔ D'étudier dans notre modèle de SE, les effets de l'EpoRH, et de l'EpoRH associée aux 3 expositions hypoxiques, sur la réponse inflammatoire précoce du SNC, c'est à dire, l'expression des principales cytokines pro-inflammatoires et chimiokines, et l'infiltration des monocytes/ macrophages dans le parenchyme cérébrale.
- ➔ Dans ces mêmes conditions expérimentales, de mesurer les variations d'expression des gènes impliqués dans la survie ou la mort des neurones.

Nous montrons que les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH:

- ne sont pas associés à une réduction des pics d'expression des cytokines inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$  10 heures après le SE.

- ne sont associés ni à une réduction des pics d'expression des chimiokines MCP-1, MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$  10 heures post-*SE*, ni à une diminution de l'infiltration des monocytes/ macrophages 24 heures post-*SE*.
- sont associés à une réduction non seulement de l'expression des « gènes de mort », mais aussi de celle des « gènes de survie » 10 heures après le *SE*.
- sont associés à une réduction de l'activation microgliale observée 6 jours post-*SE*.

Dans cette étude, nous montrons pour la première fois, que l'EpoRH peut exercer des effets neuroprotecteurs sans modifier la réponse inflammatoire précoce. Le fait que cette neuroprotection soit associée à une diminution de l'expression des gènes de « survie » et de « mort », indique que l'EpoRH réduit la souffrance neuronale à la suite du *SE*. Nous réaliserons prochainement une analyse protéomique de telle sorte à déterminer les voies de signalisation intracellulaire privilégiées par l'EpoRH dans notre modèle de *SE*. Pour ce faire, nous envisageons de doser dans nos différentes conditions expérimentales, les formes activées (phosphorylées) des protéines Akt, Erk, STAT-5, et I $\kappa$ B dans le tissu cérébral par la technique Elisa.

## **Molecular and cellular mechanisms of erythropoietin-mediated neuroprotection during epileptogenesis**

Pascal E. Sanchez <sup>1-5</sup>, Raafat P. Fares <sup>1-5</sup>, Fabrice P Navarro <sup>1-5</sup>, Chantal Bonnet <sup>1-5</sup>, Béatrice Georges <sup>1-5</sup>, Colette Moulin <sup>1-5</sup>, Amor Belmeguenai <sup>1-5</sup>, Jacques Bodennec <sup>1-5</sup>, Anne Morales <sup>1-5</sup>, Laurent Bezin <sup>1-5\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Lyon, F-69622, Lyon, France;

<sup>2</sup> Université Lyon 1, Villeurbanne;

<sup>3</sup> CNRS, UMR5123, Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire;

<sup>4</sup> IFR 41;

<sup>5</sup>. CTRS-IDEE and Hospices Civils de Lyon;

### **Keywords:**

Neuroinflammation, monocytes/ macrophages/ Interleukin/ Chemiokine/ erythropoietin receptor

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the CNRS and the Université Lyon 1. Sanchez PE is a fellow from the Délégation Générale pour l'Armement, Ministère français de la défense.

Corresponding author: **Laurent Bezin**

UMR5123, 43 bd du 11/11/1918,

F-69622 Villeurbanne cedex, France.

*e-mail*: laurent.bezin@univ-lyon1.fr

*Phone* : +33 (0)472 445 841

*Fax* : +33 (0)472 431 172

## INTRODUCTION

Recombinant human erythropoietin (rhEpo) is a neuroprotective agent that has been successfully tested not only in a wide variety of experimental model of neurodegeneration, but also in humans affected by neurological disorders<sup>22,92,155,187</sup>. When rhEpo binds to its receptor EpoR, essentially expressed by neurons in the CNS<sup>176</sup> (paper n°1-2), activation of intracellular signaling proteins such as PI3K/ Akt, STAT-5, MAPk and NFkB, promote neuronal robustness<sup>154</sup>. The observation that rhEpo-induced neuroprotection is associated with the reduction of the inflammatory response in some studies<sup>4,31,210,243,264,289</sup>, have suggested that rhEpo may promote neuroprotection by driving anti-inflammatory effects.

Following Pilocarpine-induced Status Epilepticus (Pilo-SE) in adult rat, we recently demonstrated that neuroprotective effects of rhEpo in the hippocampus could be extended to neuronal population of the ventral limbic region (VLR), by enhancing neuronal expression of the EpoR before the induction of the SE.

In the following study, we attempted to elucidate the mechanisms by which rhEpo treatment protects neurons following Pilo-SE, studying the intra-neuronal signaling pathway and the acute inflammatory response in the rat brain.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### **Experiment 1. Immunohistochemical analysis in the rat brain after Pilocarpine-induced Status Epilepticus.**

Male adult Sprague-Dawley rats underwent two hours of Status Epilepticus induced by pilocarpine hydrochloride (Sigma) injection (Pilo-SE). Rats subjected to Pilo-SE received or not three injections of rhEpo (Eprex®, generously provided by Janssen-Cilag) at 5,000 IU/kg intra-peritoneally, immediately after cessation of SE, and then 1 day and 3 days later (as previously described in paper n°2). Among the rats subjected to Pilo-SE and treated by rhEpo, half of them were exposed to three hypoxia exposures (3H) as described below, prior to Pilo-SE. To summarize, this experiment included four animal groups: 1) controls, 2) Pilo-SE, 3) Pilo-SE treated with rhEpo so-called "Pilo-SE+rhEpo", 3) "Pilo-SE+rhEpo" exposed to 3H before Pilo-SE so-called "3H+Pilo-SE+rhEpo". In each group, rats were sacrificed either at one day (3 rats in each group) to detect brain-infiltrated monocytes/ macrophages, or at six days (5 rats in each group) to evaluate neuronal loss and reactive microgliosis. When animals were sacrificed one day after Pilo-SE, rhEpo treatment consisted of a single injection of rhEpo after cessation of the SE.

### **Experiment 2. Transcript level of genes involved in the acute inflammatory response, cell survival and cell death pathways 10 hours after Pilo-SE.**

Transcript levels of *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *TNF- $\alpha$* , *MCP-1*, *MIP-1 $\alpha$* , *MIP-1 $\beta$* , *IAP-1*, *IAP-2*, *IAP-3*, *Bcl-2*, *Bcl-xl*, *Bcl-xs*, *Bid* and *Bad* were measured by calibrated RT-quantitative PCR (RT-qPCR) in the neocortex (NC), the dorsal hippocampus (Hi), the dorsal thalamus (ThD) and the ventral limbic region (VLR) 10 hours after the SE

onset. Experimental groups consisted of control (n=4), Pilo-SE (n=5), Pilo-SE+rhEpo (n=6), and 3H+Pilo-SE+rhEpo (n=6). Because animals were sacrificed 10 hours after Pilo-SE onset in this experiment, rhEpo treatment consisted of a single injection (5,000 IU/kg, i.p.) immediately after the end of the SE.

## MATERIALS

**Animals.** All animal experiments were in compliance with the guidelines of the European Union (directive 86/609), taken into the French law (decree 87/848), regulating animal experimentation. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used. Male Sprague-Dawley rats (Harlan, Gannat, France) were used throughout the experiments. They arrived at 5 weeks old in approved facilities, and housed at 21°C under diurnal lighting conditions (lights on from 06:00 am to 06:00 pm). They were maintained in groups of 4-6 in plastic cages (type "E" cages, Charles River, France) with free access to food and water. After 2 weeks of acclimatization, rats underwent 3 weeks of experimental procedure. Following Pilo-SE, rats were housed individually to support recovery until being sacrificed. Control rats were housed in groups of 4 throughout all the experiment to avoid deleterious effects related to stress isolation. Control rats received systematically corresponding injections of saline solution.

**Hypoxia exposures.** The hypoxia program consisted of the repetition of 3 hypoxia exposures carried out 4 days apart (Navarro 2008, Papier n°2). Hypoxia was realized by introducing rats within a chamber (Biospherix), the oxygen (O<sub>2</sub>) proportion of which decreased progressively from 21% to 8% in 1h. Each hypoxia exposure was maintained at 8% O<sub>2</sub> during 6h. O<sub>2</sub> proportion was automatically

regulated by the Pro-Ox system (Biospherix). Rats underwent Pilo-SE three days after the third hypoxia exposure.

### **Pilocarpine-induced Status Epilepticus.**

Scopolamine methylnitrate (1 mg/kg in saline subcutaneously; Sigma) was administered 30 min prior to pilocarpine hydrochloride (350 mg/kg in saline i.p.; Sigma). SE was stopped 2 h after its onset by i.p. injection of 10 mg/kg diazepam (Valium<sup>®</sup>, Roche), followed 4 h later by two s.c. injections of 5 mg/kg diazepam, 4 h apart.

**Ex vivo procedures.** All rats were deeply anesthetized with a lethal dose of pentobarbital (250 mg/kg, i.p.) before being sacrificed. For biochemical analysis, animals were transcardially perfused with chilled saline 0.1M phosphate buffer (PBS 0.1 M) to rinse the brain. Brain structures were then rapidly microdissected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. For immunohistochemistry analysis, animals were transcardially perfused with chilled 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer (PB). After cryoprotection in 25% sucrose, brains were frozen at -40°C in isopentane and stored at -80°C.

## METHODS

### **Calibrated Reverse Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR).**

Variations in transcript levels were determined by real time PCR amplification of cDNAs of interest after calibrated in the presence of a synthetic Poly(A) RNA used as an external standard, as previously described (Morales 2006). Sequences of the different primer pairs used for amplification are listed in Table P3.1. Transcript levels have been expressed in percent of controls throughout the

manuscript. All the copy numbers detected in controls are reported in Table P3.2.

**Immunohistochemistry.** Free floating sections (40  $\mu\text{m}$  thick) from paraformaldehyde-fixed tissue were incubated with a mouse monoclonal anti-NeuN antibody (MAB-377; Chemicon), a mouse monoclonal anti-cd11b antibody (Chemicon; CBL1512Z), or a mouse monoclonal anti-GFAP antibody (G-3893; Sigma). Sections were then incubated with a biotinylated donkey antibody raised against mouse IgG (715-065-151; Jackson ImmunoResearch) for NeuN and CD-11B detections, and with an alexa-633-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (A-21052; Molecular Probes; 1:1,000) for GFAP staining.

**Detection of brain-infiltrated immune cells *in situ*.** Previous results showed that brain-infiltrated macrophages expressed heparane sulfate (HS) chain at their membrane (Navarro et al, in preparation). To detect the HS, we used a biotinylated heparanase peptide (Covalab) which has a high affinity for the HS. The description of the peptide sequence has previously been described (Navarro FP, in preparation). Free floating sections from paraformaldehyde-fixed tissue were incubated with the biotinylated heparanase peptide at 10  $\mu\text{M}$  in 0.1 M PBS for 24 hours (room temperature: RT). Sections were then incubated with avidin biotin peroxydase (1:500; Vectastain Elite ABC kit, Vector) and reacted with 0.4 mM 3',3'-diaminobenzidine (DAB, Vector). Sections were mounted on Superfrost®Plus slides.

**Fluorescent dual-immunolabelings.** For dual-immunohistochemistry of EpoR or cd11b with HS, free floating sections from paraformaldehyde-fixed tissue were firstly incubated overnight (RT) with a rabbit polyclonal anti-EpoR antibody (sc-697; Santa

Cruz; 1:500) or a mouse monoclonal anti-cd11b antibody (CBL1512Z; Chemicon; 1:1,000). Brain slices were then incubated for 3 hours (RT) with an alexa-488-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody (A-21206; Molecular Probes; 1:1000) or an alexa-488-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody (A-21202; Molecular Probes; 1:1,000) respectively. After multiple washes, brain sections were then incubated with the biotinylated heparanase peptide (Covalab) diluted at 10  $\mu\text{M}$  in 0.1 M PBS for 24 hours (RT), and finally with streptavidin-Alexa 633 (Molecular Probes). For dual immunohistochemistry of EpoR with cd11b, brain slices were incubated overnight (RT) with both anti-EpoR and cd11b antibodies. Then, slices were incubated for 3 hours with a solution containing the alexa-488-conjugated donkey anti-rabbit IgG antibody and an alexa-633-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (A-21052; Molecular Probes; 1:1,000). Finally, sections were mounted on SuperFrost®Plus slides and coverglassed with Vectashield reagent (Vector). The specificity of the anti-EpoR antibody used has been thoroughly characterized and discussed in a previous paper (Papier n°1).

**Statistical analysis.** Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of the different variables analyzed (transcript level) and were compared among groups by using one-way ANOVA followed by Fisher's protected Least Significance Differences (LSD) test.

## RESULTS/ DISCUSSION

### Neuronal loss after Pilo-SE is preceded by a rapid induction of inflammatory cytokine transcript level.

Using the specific neuronal marker NeuN, we confirmed six days after Pilo-SE that neurodegeneration occurring in forebrain areas <sup>198,253</sup> affected more extensively the VLR and the ThD in comparison with the NC and the Hi (Figure P3.1A).

Prototypic inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , have been proposed as playing an essential role in neurodegenerative processes following SE <sup>198,261,262</sup>. Therefore, we investigated whether distinct induction profiles of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  transcript levels could explain the differences in neuronal loss between the four brain areas studied after Pilo-SE. All measures were performed 10h after Pilo-SE onset (Figure P3.1B), since apparent peaks of induction in the Hi <sup>180</sup> and other brain areas (data not shown) were observed between 8-12 h following the onset of Pilo-SE. We noted that VLR was the structure where inductions of cytokine transcript levels above control values were the greatest (Figure P3.1B.1). However, the copy number of each cytokine cDNA measured in controls being different in the four brain areas (Table P3.2), the percentage of induction did not reflect the absolute tissue amount of each transcript after Pilo-SE (Figure P3.1B.2). Interestingly, IL-1 $\beta$  mRNA was the only transcript, the tissue concentration of which was greater in both the VLR and the ThD, compared to the NC and the Hi, 10h after Pilo-SE. It may thus be likely that IL-1 $\beta$  tissue concentration is critical for neuronal viability in a context of brain hyperexcitability. In support of this notion, increased IL-1 $\beta$  signaling has been reported to exacerbate excitotoxic neuronal death <sup>7,16,269</sup>.

### Neuroprotection induced by rhEpo was not associated with a lower induction of inflammatory cytokine transcript levels.

In these experiments, we first confirmed our previous results, showing that: i) neurodegeneration in the dorsal hippocampus of naïve rats subjected to Pilo-SE (Figure P3.2A-B), was significantly reduced by post-treatment with rhEpo (Figure P3.2C) <sup>176</sup> (Paper n°2), and ii) rhEpo protected neurons of the VLR only when rats were subjected to three hypoxia exposures prior to Pilo-SE (Figure P3.2E-H) (Paper n°2). We also confirm previous studies <sup>267</sup> showing that astrocytes are subjected, as neurons, to fast and dramatic degenerative processes (data not shown), leading, 6 days after Pilo-SE, to their complete loss at loci devoid of surviving neurons, as exemplified in the amygdala (Figure P3.3A,B). Interestingly, when neurons were protected by rhEpo (3H/Pilo-SE/rhEpo group), astrocytes were also spared, while bearing some morphological features of activated astrocytes (Figure P3.3C).

We then investigated whether rhEpo-induced neuroprotective effects after Pilo-SE were associated with a lower induction of pro-inflammatory cytokine transcript levels occurring during the acute phase (up to 36h) after Pilo-SE <sup>198</sup>. Indeed, rhEpo treatment reduced pro-inflammatory cytokine (protein and/or transcript) levels in models of brain ischaemia <sup>243,264</sup>, brain and spinal cord injury <sup>4</sup>, and encephalomyelitis <sup>210</sup>. We found, 10h after Pilo-SE, that rhEpo did not reduce IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  transcript levels in any structures (NC, Hi, ThD and VLR) and any conditions (Pilo-SE/rhEpo and 3H/Pilo-SE/rhEpo) tested (data not shown). Two exceptions were noticed: i) in the Hi, IL-1 $\beta$  mRNA was significantly higher ( $+145 \pm 70$  %;  $p < 0.05$ ) in the 3H/Pilo-SE/rhEpo group compared with the

Pilo-SE group, and 2) in the VLR, IL-6 mRNA was significantly reduced ( $-55 \pm 7 \%$ ;  $p < 0.01$ ) in the 3H/Pilo-SE/rhEpo group compared to the Pilo-SE/rhEpo group.

These results demonstrate that neuroprotective effects of rhEpo cannot be attributed to a reduced activation of genes encoding prototypic inflammatory cytokines during the acute phase following SE. Up-regulation of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  transcripts occurs in glial cells (microglia and astrocytes) during the acute phase after Pilo-SE<sup>180,263</sup>. These cells do not express detectable levels of EpoR, neither before SE (papier n°2) nor at the time of rhEpo administration<sup>176</sup>. The absence of effect of rhEpo treatment on the induction of pro-inflammatory cytokines may thus be explained by the fact that glial cells could not be targeted by rhEpo directly.

**Expression of genes involved in cell death/survival is lowered in the VLR when rhEpo displays neuroprotective effects.**

EpoR activation in neurons triggers complex neuroprotective signaling pathways whose the best characterized are PI3K/ Akt, STAT-5, MAPk and NF $\kappa$ B<sup>154</sup>. Once phosphorylated, these proteins activate or inhibit others downstream molecules which induce or repress transcription of genes involved either in cell death ("death-genes") or in cell survival ("survival-genes"). Here, we investigated whether the transcript levels of some of these genes were altered by rhEpo treatment. This was approached in the VLR exclusively, in two distinct conditions, one being associated with neuroprotection following Pilo-SE (3H/Pilo-SE/rhEpo), and the other not (Pilo-SE/rhEpo). It is noteworthy that neuroprotective effects of rhEpo after 3H followed induced expression of its receptor in neurons (papier n°2). Transcript levels of i) "death-genes" such as Bcl-xs, Bid and Bad, and

ii) "survival-genes" such as IAP-1, IAP-2, IAP-3, Bcl-xl, Bcl-2 and BDNF, were measured by RT-qPCR 10h after Pilo-SE (Figure P3.4), at a time preceding extensive neuronal loss in the VLR<sup>46</sup>.

We observed that Pilo-SE significantly increased transcript levels, not only of "death genes" (Bcl-xs and Bid), but also of "survival genes" (IAP-1, IAP-2, Bcl-2 and BDNF), the greatest inductions (up to 1,500%,  $p < 0.001$ ) being found for BDNF and IAP-1. As expected, rhEpo treatment, which by itself was not sufficient to protect neurons in the VLR of rats subjected to Pilo-SE (Pilo-SE/rhEpo group), did not alter transcript levels of "death genes" and "survival genes" in comparison with the Pilo-SE group. By contrast, rhEpo treatment in rats subjected to hypoxia exposures prior to Pilo-SE, which was neuroprotective in the VLR (3H/Pilo-SE/rhEpo), significantly reduced the transcript level of the "death genes" Bcl-xs, Bid and Bad compared to the Pilo-SE group. Intriguingly, in the 3H/ Pilo-SE/ rhEpo group, we also noted a decrease in transcript levels of the "survival genes" IAP-2, IAP-3, Bcl-2 and BDNF. Assuming that protein and transcript levels are concordant, it is very likely that the decreased "survival gene" expression in response to rhEpo treatment occurred in neurons, which are the only cells that expressed EpoR after 3H (papier n°2). The observations that neurons were still alive in the VLR 6 days after Pilo-SE, despite the reduced expression of "survival genes" at 10h, suggests that rhEpo triggered rapidly in neurons "unknown" signaling pathways, reinforcing their robustness to face more efficiently glutamate toxicity.

### **Altered microglial activation state by rhEpo during epileptogenesis (6 days after Pilo-SE).**

Microglial cells, and to some extent astrocytes, are considered as the main effectors of the innate response after intensive hyperexcitability states<sup>71,91</sup>, such as occurring during the acute phase after Pilo-SE<sup>198</sup>. However, whether glial activation has beneficial or adverse effects on neurons remains controversial<sup>91</sup>. In the VLR, since astrocytes died massively concomitantly to neurons (Figure P3.3A,B), they could not contribute to the innate immunity during the acute phase after Pilo-SE, contrasting with the hippocampus, where reactive astrogliosis has been extensively reported following Pilo-SE<sup>180,198,267</sup>. Ongoing studies report that activated microglia may serve beneficial effects for neurons in models of brain injury<sup>91,134,182,236</sup>. However, in some contexts, activated microglia has the potential to synthesize and release cytotoxic molecules after SE, including IL-1 $\beta$ <sup>49,198</sup>, which is proposed to contribute to the onset of epilepsy<sup>261,262</sup>.

As already shown by us and others<sup>180,198</sup>, microglial cells were subjected to morphological changes following Pilo-SE, that were associated with an increased intensity of CD-11b labeling (Figure P3.5-A). While displaying small cell bodies with thin and extensive ramifications in control conditions (Figure P3.5B1), microglial cells present as clusters in the damaged areas six days after the SE acquired larger cell bodies with thicker and shorter processes (Figure P3.5B2), as previously described<sup>241</sup>. This morphological transformation of microglial cells, the so-called "reactive microgliosis", has been associated with a change in their function, shifting from a surveillance toward a reactive mode to cope with altered homeostasis<sup>91</sup>. Interestingly, reactive microgliosis was mainly localized in

the most damaged brain areas, such as the ThD, the Hi, and above all, the VLR (Figure P3.5-A).

We tested whether rhEpo treatment, combined or not with repeated hypoxia, could modify the morphological changes of microglial cells following Pilo-SE. We found that "reactive microgliosis" in the amygdala was reduced by rhEpo treatment only when rats were subjected to repeated hypoxia prior to Pilo-SE (Figure P3.5B4).

### **Neuroprotective effects of rhEpo in the VLR were not associated with a reduced brain infiltration of monocytes.**

In the condition where rhEpo was neuroprotective in the VLR, it is likely that spared neurons sent less altering signals to resident microglial cells, making it possible, for the majority of them, to retain morphological features of their surveillance mode. One other explanation might be that glial cells (both microglia and astrocytes) produced less chemokines, which are required for circulating monocytes to invade the brain parenchyma and differentiate into activated microglia<sup>11,91,236</sup>. To test this hypothesis, we measured some chemokine transcript levels, previously shown to be highly increased in the hippocampus after Pilo-SE in mice<sup>251</sup>, the apparent peak of induction in rats being observed 8-24h post Pilo-SE in the hippocampus for *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1, or CCL2), for *macrophage inflammatory protein-1alpha* (MIP-1 $\alpha$ , or CCL3), and for MIP-1 $\beta$  (or CCL4)<sup>180</sup>. Here, we show 10h after Pilo-SE that: i) MCP-1, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  transcript level were strongly increased in all brain structures studied (Figure 6A), and ii) rhEpo treatment, combined or not with repeated hypoxia, had no effect on MCP-1, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  transcript levels at 10h post-Pilo-SE (data not shown).

We previously showed that the induced chemokine expression in the hippocampus following Pilo-SE in rats preceded the brain extravasation of monocytes<sup>180</sup>. This was demonstrated using a peptidic sequence (PepHep), labeling specifically heparan sulfate (HS) chains present at the cell surface of infiltrating monocytes, specifically identified as CD11b<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> cells<sup>180</sup>. Here, we show that PepHep positive monocytes massively invaded the NC, the Hi, the ThD and the VLR from brain capillaries after Pilo-SE, as illustrated 24h after the onset of SE (Figure P3.6B). Treatment with rhEpo in rats subjected to 3H/Pilo-SE, which is a condition associated with neuronal protection, did not modify the profile of monocyte infiltration in the four brain areas studied (Figure P3.6.B). The altered state of microglial activation observed when rhEpo induces neuroprotective effects in the VLR (3H/Pilo-SE/rhEpo group) was thus not associated with a reduced infiltration of monocytes within the brain parenchyma.

### **Epo does not directly modify the microglial differentiation of infiltrating monocytes.**

We previously provided evidence in the hippocampus that maintaining long term microglial activation after Pilo-SE may result from the microglial differentiation of infiltrating monocytes<sup>180</sup>. Direct effect of rhEpo on resident microglial cells was precluded by the fact that microglial cells did not express, neither under basal conditions, nor after Pilo-SE<sup>176</sup> (papier n°2). Since rhEpo-induced neuroprotection in the VLR was not associated with a reduced infiltration of monocytes (see below), we investigated whether rhEpo might have directly targeted infiltrating monocytes.

We show here in the amygdala (Figure P3.7A) that infiltrating monocytes, which express HS chains at their cell surface, express high level of EpoR, both in rats exposed or not to 3H prior to Pilo-SE. The monocytes were clearly associated to the walls of brain capillaries, starting their progression toward the brain parenchyma (Figure P3.7B). Confocal microscopy analysis revealed that monocytes expressed comparable levels of EpoR both in rats subjected or not to 3H (data not shown), indicating that the alteration of microglial activation observed exclusively in rats subjected to 3H/Pilo-SE/rhEpo was not due to a differential expression of EpoR in infiltrating monocytes.

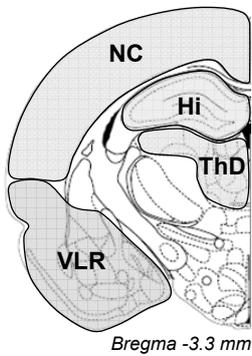
### **CONCLUSION**

For the first time, we provide evidence that rhEpo can exert neuroprotective effects without reducing the induction of prototypic pro-inflammatory cytokine expression after a brain injury. Regarding to the decrease expression level of both "survival" and "death" genes, it is very likely that rhEpo, by targeting directly neurons may decrease the neuronal suffering. At the moment, further experiments are ongoing in order to determine intracellular proteins that may be involved in rhEpo-induced neuroprotection. In addition, the strong EpoR expression in infiltrated monocytes/macrophages, observed 24 hours after Pilo-SE, encourages us to investigate whether rhEpo may have effects on the differentiation and activation of these cells.

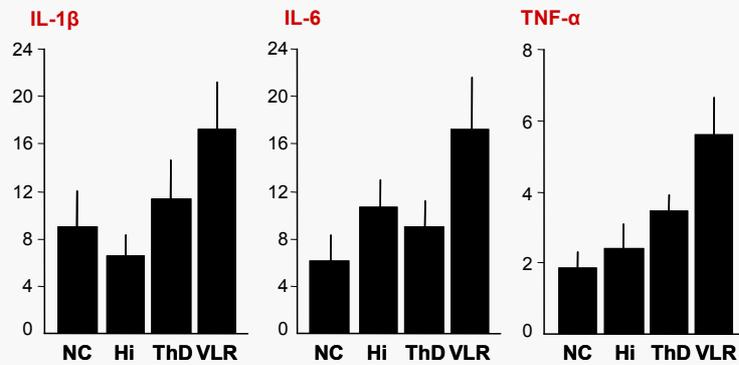
## A/ Neuronal loss 6 days following Status Epilepticus



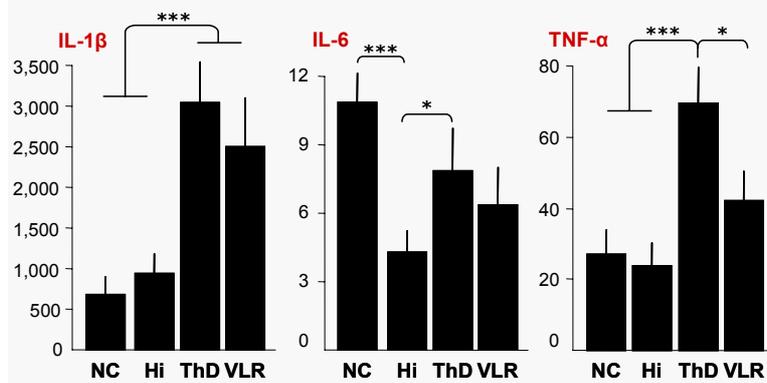
## B/ cDNA level of pro-inflammatory molecules 10 h post-SE (factor 1,000)



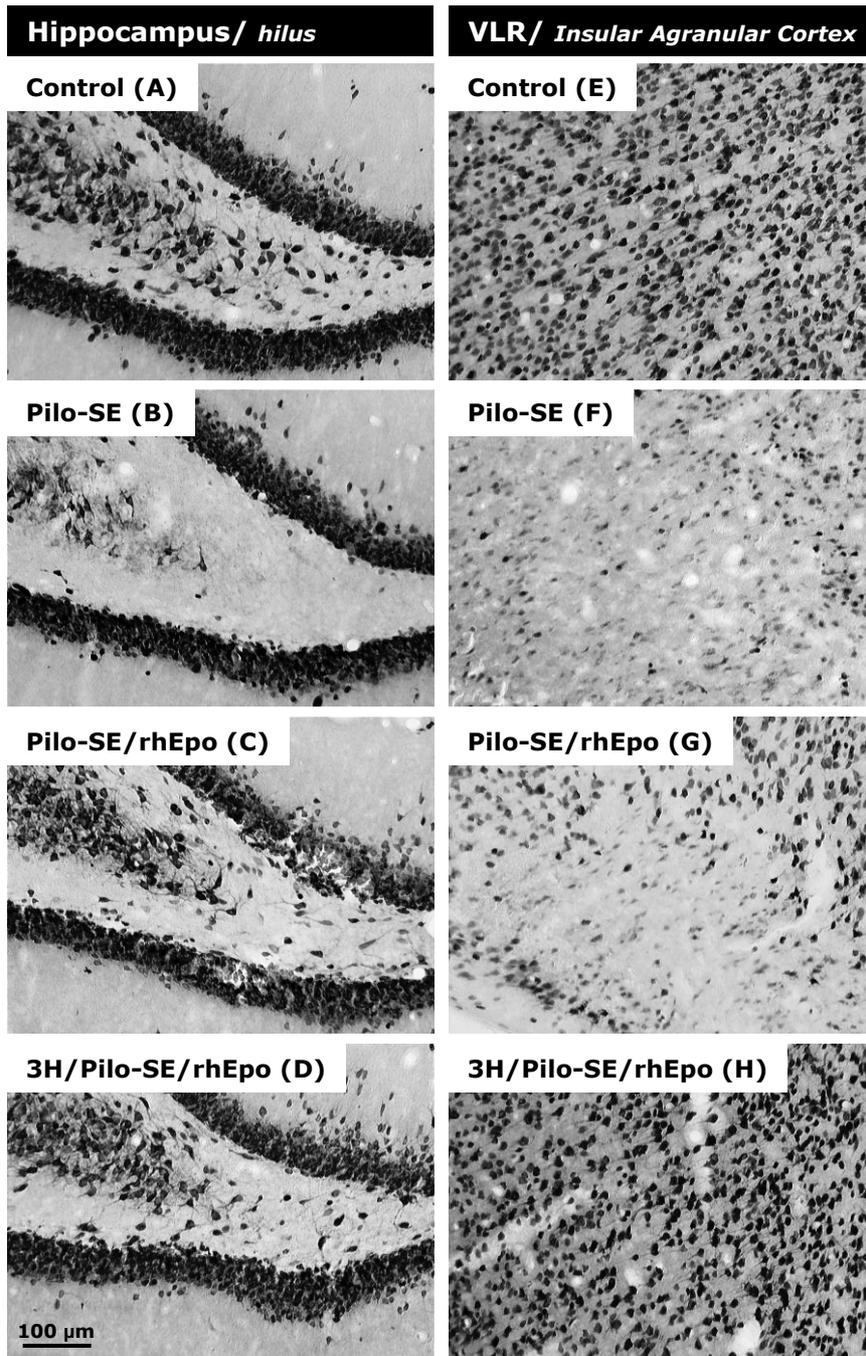
### B.1 In percent of control



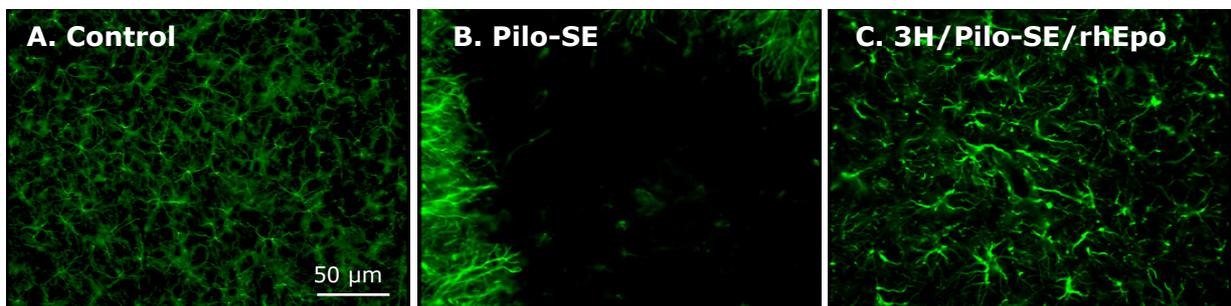
### B.2 Number of detected cDNA copies



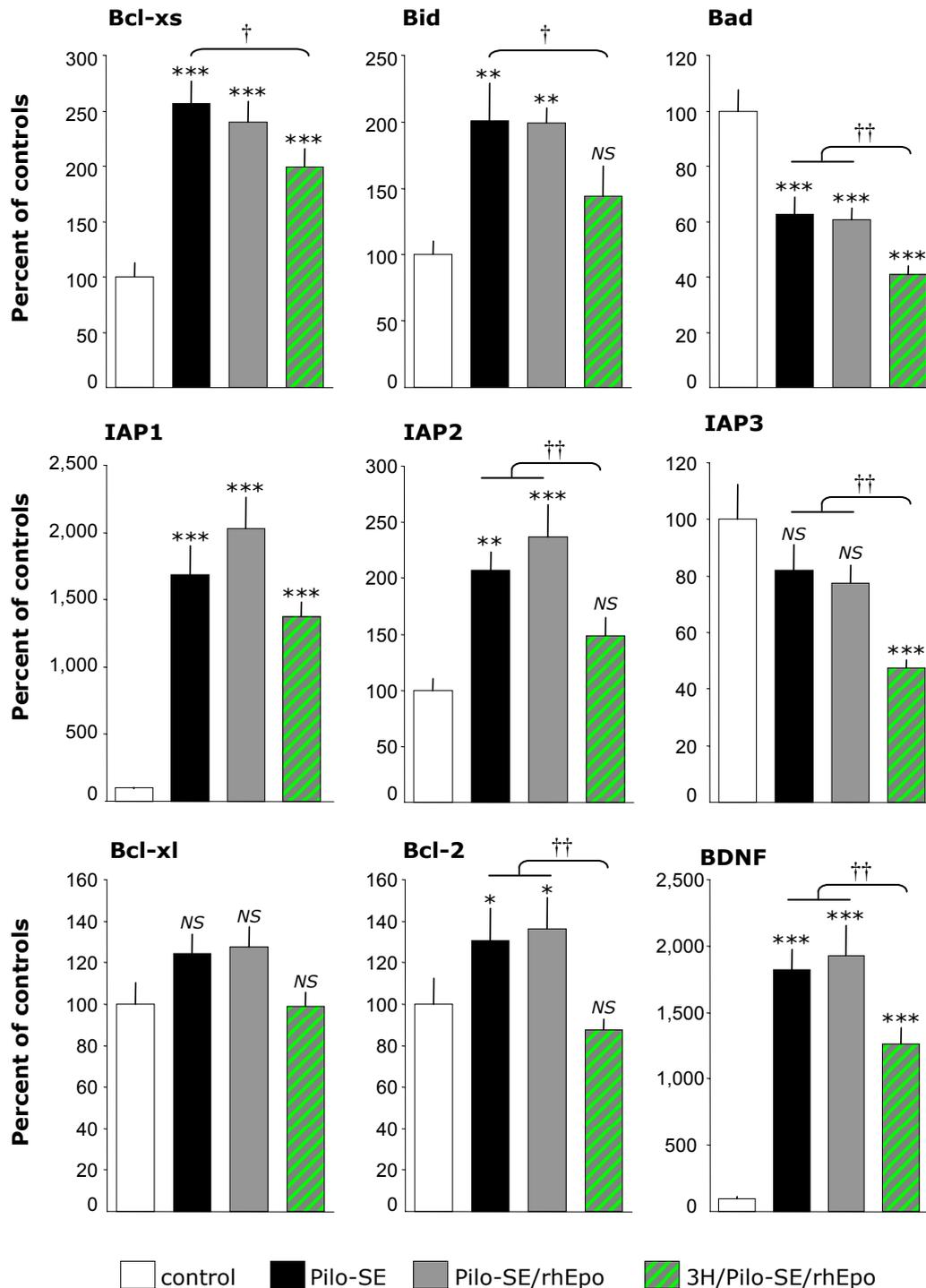
**Figure P3.1. Neurodegeneration following Status Epilepticus was preceded by an acute induction of pro-inflammatory cytokines.** (A) Six days after Pilo-SE, neuronal loss was visualized using NeuN immunostaining. Images captured at interaural 5.40 mm, illustrate damaged areas in the rat brain. Neuronal loss was particularly dramatic in the ThD and the VLR (red-shaped areas). (B) IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  transcript levels were measured by RT-qPCR 10 hours after the SE onset in the NC, the Hi, the ThD and the VLR, dissected as shown in the left panel. High inductions were observed above controls for all cytokines in all brain area analyzed (Anova 1;  $p < 0.001$  in comparison to control). In panel B.1, cDNA levels of animals subjected to Pilo-SE are expressed in percent of controls (values of cDNA copy number for controls are given in Table P3.2). In panel B.2, cDNA levels of animals subjected to Pilo-SE are expressed in number of detected cDNA copies. Statistical differences between cDNA copy number of the 4 brain areas were performed by Anova 1 (\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ ). All bars represent mean  $\pm$  SEM. Abbreviations: Hi, dorsal hippocampus; NC, neocortex; Pilo-SE, pilocarpine-induced Status Epilepticus; ThD, Dorsal thalamus; VLR, ventral limbic region.



**Figure P3.2. Neuroprotective effects of rhEpo treatment, combined or not with three hypoxia exposures, observed six days after Pilo-SE.** Immunohistochemical detection of NeuN in the Hilus and the Insular Agranular Cortex (IAC) six days after Pilo-SE showed that rhEpo treatment protected hippocampal interneurons (C) but not neurons of the IAC (G). By contrast, rhEpo-treated rats that were subjected to repeated hypoxia prior to Pilo-SE, exhibited an almost total neuroprotection of the hilus (D) and the IAC (H). Abbreviations: 3H, three hypoxia exposures; as in figure P3.1.

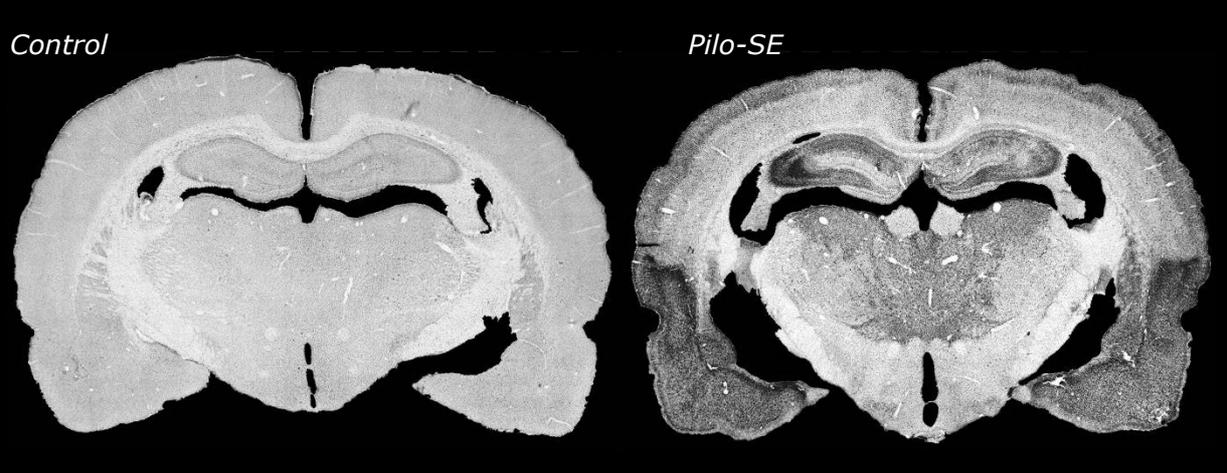


**Figure P3.3. Complete abolition of astrocyte population 6 days after Pilo-SE is reversed by rhEpo-induced neuroprotection in the VLR.** Astrocytes were detected using GFAP immunostaining six days after Pilo-SE. Images captured in the amygdala at interaural 5.40 mm, illustrate the loss of astrocyte population within the area of neurodegeneration (B), which is completely reversed by the rhEpo treatment associated with 3 hypoxia exposures prior to the SE onset (C). Abbreviations: as in figure P3.1.

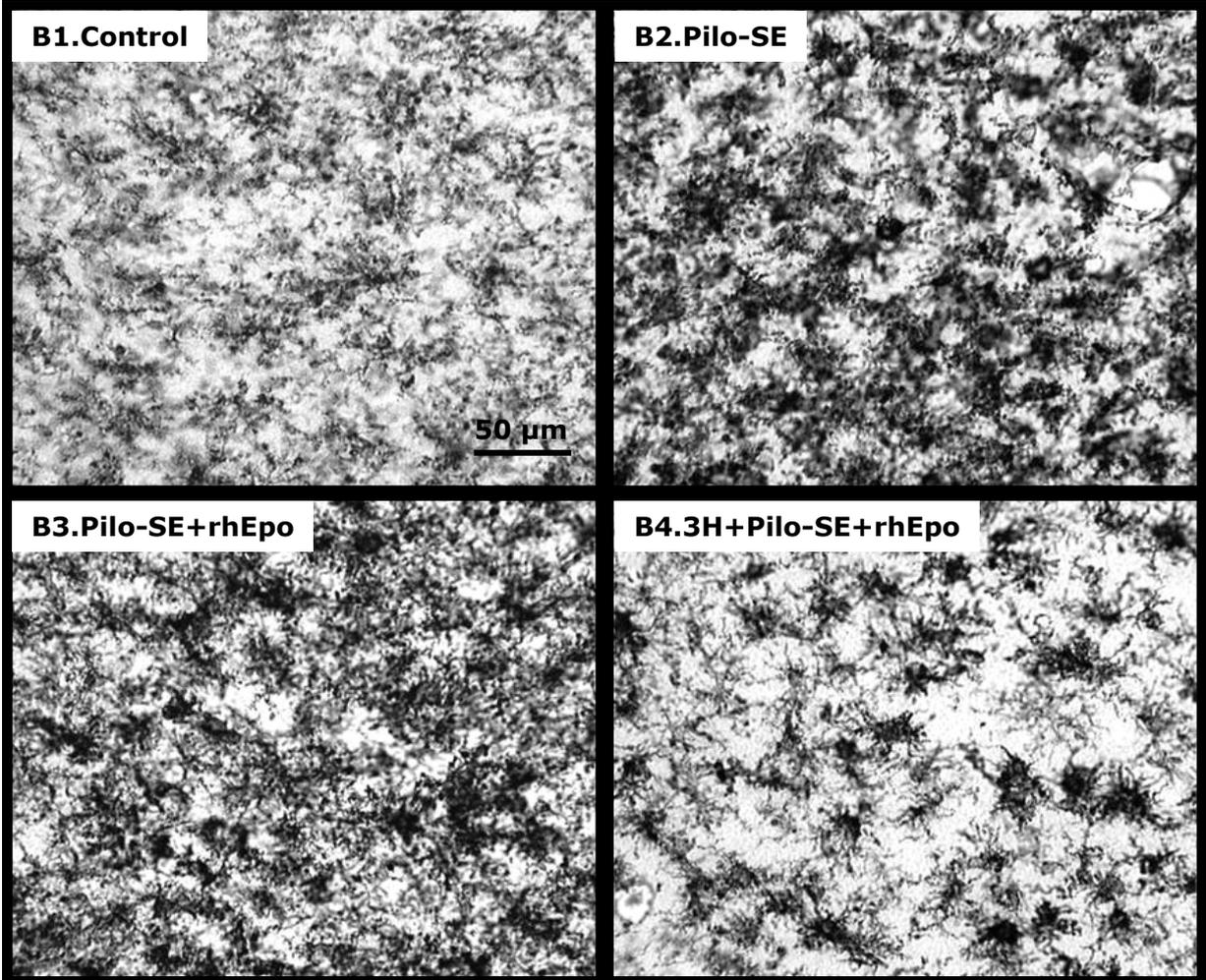


**Figure P3.4. Transcript level of genes involved either in cell death or cell survival 10 hours after Pilo-SE.** cDNA transcript level of “Death genes” such as Bcl-xs, Bid and Bad, and “survival genes” such as IAP-1, IAP-2, IAP-3, Bcl-xl, Bcl-2 and BDNF were measured by RT-qPCR in the VLR 10 hours after the SE onset. cDNA levels are expressed in percent of controls. Statistically differences were tested using an Anova 1 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  in comparison with controls and †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$  in comparison to the “3H+Pilo-SE+rhEpo” group). The exact number of detected copies in controls is given in table P3.2. All bars represent mean  $\pm$  SEM. Abbreviations: NS, no statistically differences from controls; 3H, three hypoxia exposures; as in figure P3.1.

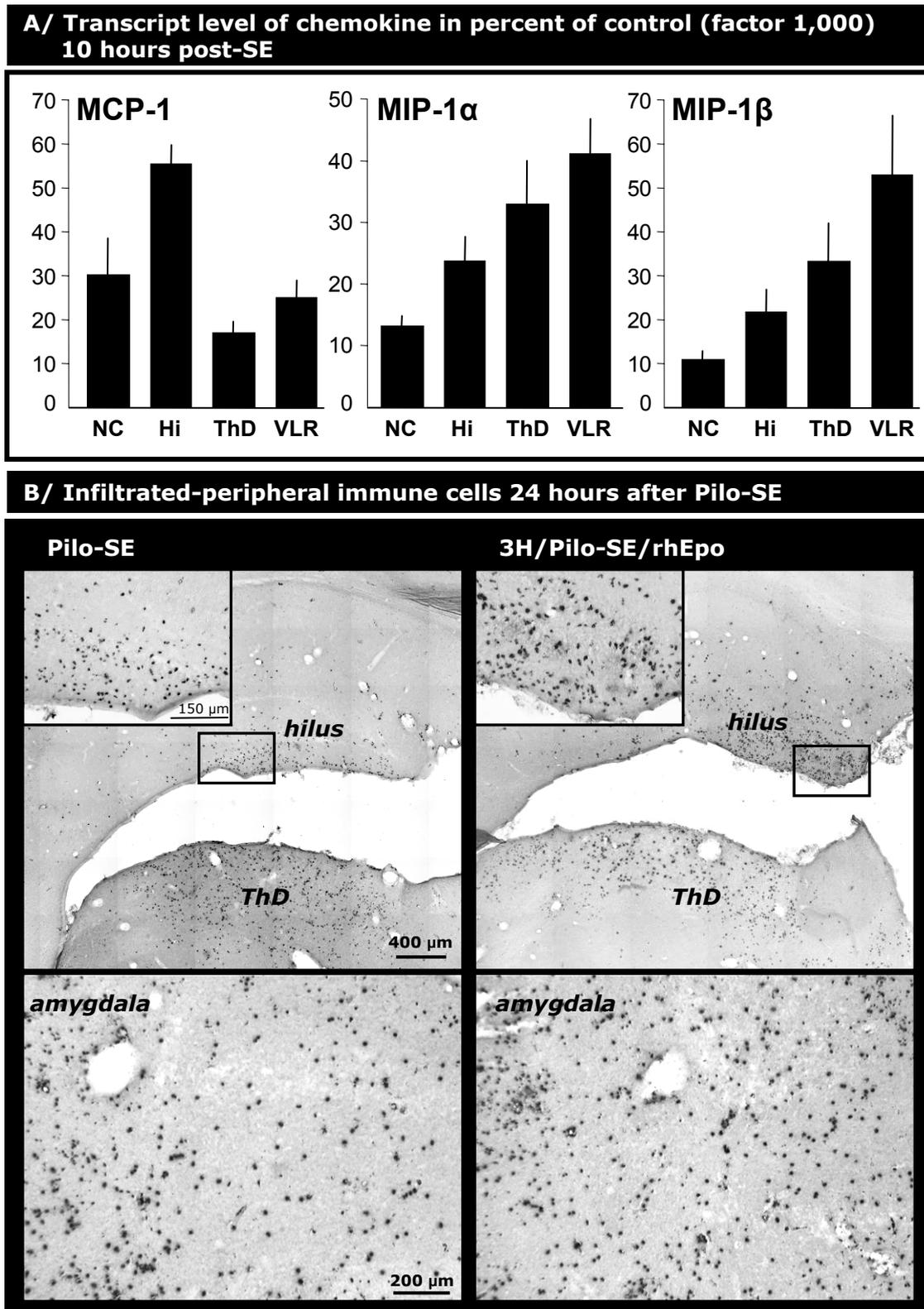
**A/ Microglial activation 6 days followings Status Epilepticus**



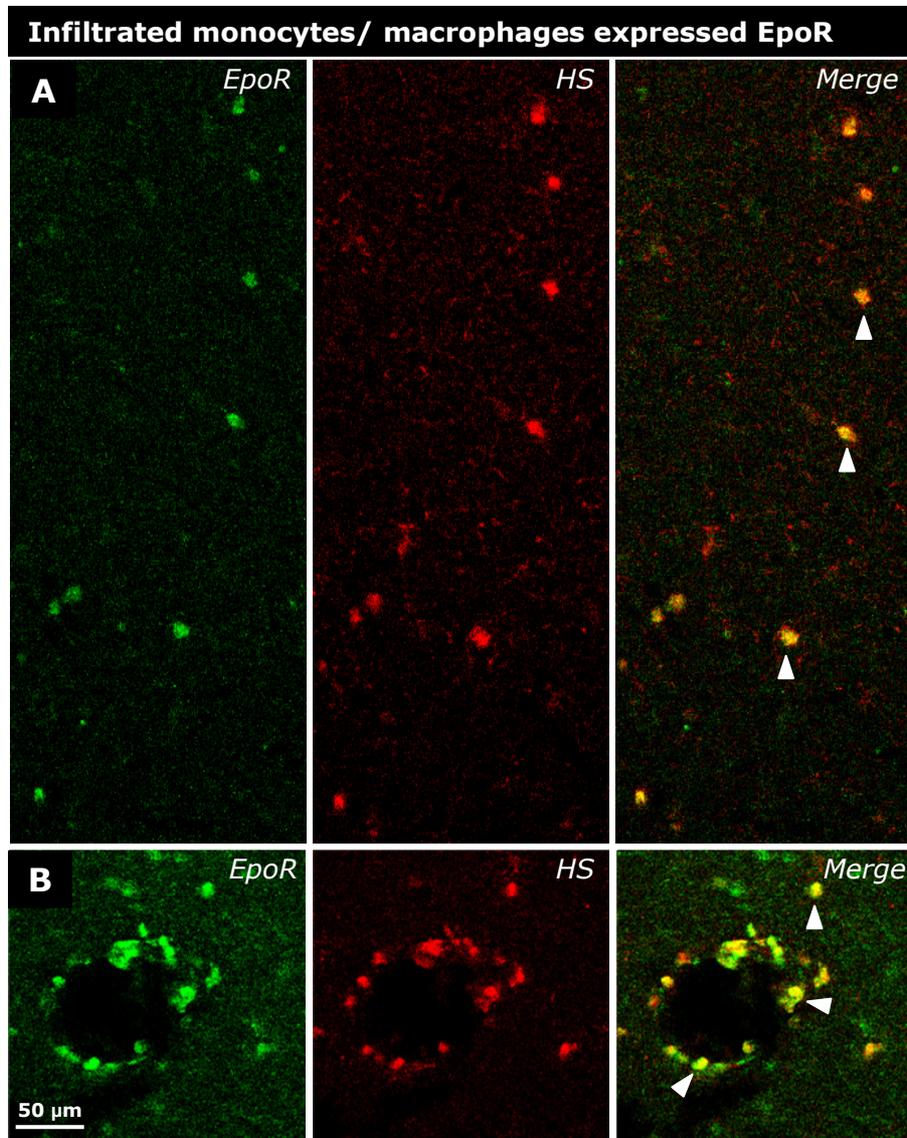
**B/ Microglial activation 6 days followings Status Epilepticus in the amygdala**



**Figure P3.5. Reactive microgliosis following Pilo-SE.** Microglial cells were detected using cd-11b immunostaining six days after Pilo-SE. **(A)** Images captured at interaural 5.40 mm, illustrate strong reactive microgliosis induced by the SE in the most damaged area of the rat brain, the ThD and the VLR. **(B)** As illustrated with higher magnification, rhEpo treatment combined with 3H remarkably decreased the reactive microgliosis. Abbreviations: 3H, three hypoxia exposures; as in figure P3.1.



**Figure P3.6. Induction of chemokine transcript level and massive infiltration of monocytes/macrophages in the brain parenchyma after Pilo-SE.** (A) MCP-1, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  transcript levels were measured by RT-qPCR 10 hours after the SE onset in the NC, the Hi, the ThD and the VLR. cDNA levels of animals subjected to Pilo-SE are expressed in percent of control. The exact number of detected copies for control is in the table 1. All bars represent mean  $\pm$  SEM. (B) One day after Pilo-SE, we detected brain-infiltrated monocytes/ macrophages in the rat brain using HS immunostaining. The number of HS positive cells was not reduced by rhEpo-induced neuroprotection treatment, as illustrated in the Hi, the ThD and the amygdala in the "3H+Pilo-SE+rhEpo" group. We did not detect any HS positive cells in control rats (data not shown). Abbreviations: HS, heparan sulfate; as in figure P3.1.



**Figure P3.7. Brain-infiltrated monocytes/ macrophages expressed EpoR one day following Pilo-SE.** Double immunolabeling of EpoR together with HS demonstrated that one day after Pilo-SE, all brain-infiltrated monocytes/ macrophages strongly expressed EpoR in the brain, as pointed out by white arrowheads in the amygdala (A), and around a capillary of the same structure (B). Abbreviations: HS, heparan sulfate; as in figure P3.1.

<b>Gene</b>	<b>Forward 5' → 3'</b>	<b>Reverse 5' → 3'</b>	<b>Genebank reference</b>	<b>Length (pb)</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	GCA CCT TCT TTT CCT TCA TCT	CCG CTT TTC CAT CTT CTT CTT	M98820.1	374
<b>IL-6</b>	TAC CAC CCA CAA CAG ACC A	TCC AGA AGA CCA GAG CAG A	NM_012589.1	243
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	CAA ACC ACC AAG CAG AGG AG	GTG AGG AGC ACA TAG TCG GG	X66539.1	175
<b>Bcl-xs</b>	TGA ACA GGA CAG TTT TGT GGA	AAA CGC TCC TGG CCT TTC	AF136230.1	72
<b>Bad</b>	GGT CTC CTG GGG AGC ATC	CTC CGG GTC TCC ATA GTC	AF031227.1	89
<b>Bid</b>	GCC TGC GTC ATG GAC TCT	GTT TCG GAG AAA GCC GAA C	AF259503.1	90
<b>IAP1</b>	CCC AGA GGA TGA GAC TGG AG	TCA CTG CAT CTT CCC AAT TCT	NM_001008292.1	71
<b>IAP2</b>	GAA AAT GCT GAC CCT CCA GT	TCA TCA CTG CAT CTT CCC AAT	AF183431.1	64
<b>IAP3</b>	GCT TGC AAG AGC TGG ATT TT	TGG CTT CCA ATC CGT GAG	AF183429.1	88
<b>Bcl-xl</b>	TGA CCA CCT AGA GCC TTG GA	CTC GGG TGC TGT ATT GTT CC	U34963.1	220
<b>Bcl-2</b>	GTC TCT GAA GAC GCT GCT CA	AGG TAT GCA CCC AGA GTG ATG	U34964.1	63
<b>BDNF</b>	AAA TTA CCT GGA TGC CGC AA	CGC CAG CCA ATT CTC TTT TT	X67108.1	345
<b>MCP-1</b>	CGG CTG GAG AAC TAC AAG AGA	TCT CTT GAG CTT GGT GAC AAA TA	M57441.1	78
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	TCC ACG AAA ATT CAT TGC TG	AGA TCT GCC GGT TTC TCT TG	U06435.1	92
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	CTC TGC GTG TCT GCC TTC T	GTG GGA GGG TCA GAG CCT AT	U06434.1	89

**Table P3.1. Sequences of the different primer pairs used for amplification by PCR.**

Gene	Neocortex (a)	Hippocampus Dorsal (b)	Thalamus Dorsal (c)	Ventral Limbic Region (d)
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	7,608 $\pm$ 456 <sup>bcd</sup>	14,522 $\pm$ 1,743 <sup>ac</sup>	23,821 $\pm$ 1,906 <sup>abd</sup>	15,223 $\pm$ 1,226 <sup>ac</sup>
<b>IL-6</b>	180 $\pm$ 36 <sup>bcd</sup>	40 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	90 $\pm$ 23 <sup>a</sup>	37 $\pm$ 9 <sup>a</sup>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	1,494 $\pm$ 314 <sup>d</sup>	978 $\pm$ 127 <sup>c</sup>	2,094 $\pm$ 314 <sup>bd</sup>	857 $\pm$ 137 <sup>c</sup>
<b>Bcl-xs</b>	ND	ND	ND	1,060 $\pm$ 138
<b>Bad</b>	ND	ND	ND	171,176 $\pm$ 11,982
<b>Bid</b>	ND	ND	ND	7,582 $\pm$ 758
<b>IAP1</b>	ND	ND	ND	5,831 $\pm$ 175
<b>IAP2</b>	ND	ND	ND	31,495 $\pm$ 3,149
<b>IAP3</b>	ND	ND	ND	155,732 $\pm$ 18,688
<b>Bcl-xl</b>	ND	ND	ND	33,805 $\pm$ 3,719
<b>Bcl-2</b>	ND	ND	ND	7,888 $\pm$ 947
<b>BDNF</b>	ND	ND	ND	55,704 $\pm$ 8,356
<b>MCP-1</b>	24,149 $\pm$ 3,139	21,875 $\pm$ 1,313 <sup>c</sup>	30,406 $\pm$ 2,432 <sup>b</sup>	22,670 $\pm$ 2,267
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	4,383 $\pm$ 394	3,999 $\pm$ 320 <sup>c</sup>	6,264 $\pm$ 752 <sup>b</sup>	5,938 $\pm$ 653 <sup>b</sup>
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	605 $\pm$ 109	515 $\pm$ 87	678 $\pm$ 27	553 $\pm$ 100

**Table P3.2. Detected copy number of all cDNA studied in control animals.** Number of cDNA copies are expressed in mean  $\pm$  SEM. Statistically differences between structures were tested using an Anova 1 for each cDNA studied. For each structure, blue letters indicate the structure of which cDNA copy number is statistically different ( $p < 0.05$ ). Abbreviations: ND, not determined.

# Discussion générale

---

## **PARTIE I : IDENTITE DE L'ÉPOR DANS LE CERVEAU: VERS L'INVALIDATION DE « LA THEORIE DE LA BC ».**

L'ÉpoRH est actuellement l'un des agents neuroprotecteurs actuels les plus prometteurs, comme en témoigne le nombre important d'études cliniques en cours sur les effets de cette molécule dans le cadre des accidents et maladies neurologiques (voir le site de la NIH, répertoriant les études cliniques en cours <sup>184</sup>). Malheureusement, les effets secondaires avérés ou soupçonnés de l'ÉpoRH inquiètent dans le cadre de son utilisation chronique chez l'humain (voir Chapitre VII de l'état de l'art). En particulier, les effets hématopoïétiques de l'ÉpoRH peuvent être à l'origine de perturbations du système cardio-vasculaire chez certains patients à risques <sup>155</sup>. Ainsi, de nouvelles molécules dérivées de l'Épo ont été développées afin de conserver l'activité neurobiologique de l'ÉpoRH, tout en éliminant son activité hématopoïétique. Les deux principaux dérivés, la CEpo et l'asialoEpo, sont effectivement neuroprotecteurs dans des modèles d'atteintes du SNC chez l'animal, sans pour autant stimuler l'érythropoïèse (voir Chapitre VII.2. de l'état de l'art). Ces derniers résultats ont donc encouragé la communauté scientifique à rechercher l'identité du récepteur cible de l'Épo et de ses dérivées dans le SNC.

Sur la base des études en hématologie, il était considéré que les effets biologiques de l'Épo passaient par un récepteur homodimérique [EpoR]<sub>2</sub> <sup>113</sup>. Toutefois, des expériences réalisées sur des cellules BA/F3 ont montré que la réponse biologique à l'Épo augmente lorsque le récepteur EpoR s'associe physiquement à la chaîne βc <sup>115</sup>. Jusque dans les années 2000, il était admis, sans que cela n'ait jamais été prouvé, que le site de liaison de l'Épo dans le SNC était le récepteur EpoR, à l'identique de celui présent dans les progéniteurs érythroïdes, c'est-à-dire sous sa forme homodimérique [EpoR]<sub>2</sub>. Cependant, l'équipe de M. Brines a montré en 2004, que le maintien de la fonction motrice après lésion de la moelle épinière exercée par la CEpo chez des souris sauvages, est perdu chez des souris transgéniques n'exprimant pas le gène βc <sup>23</sup>. Ainsi est née l'idée que le récepteur de l'Épo responsable des effets neuroprotecteurs est composé d'un monomère d'EpoR et d'un homodimère de βc (EpoR/[βc]<sub>2</sub>) <sup>22</sup>. Au regard de la littérature, il semble que cette théorie ait fait rapidement l'unanimité. Pourtant, aucune preuve n'a été fournie, ni sur la présence de la βc dans les neurones exprimant l'EpoR, ni sur les variations coordonnées de l'expression cérébrale de l'EpoR et de la βc. Or, ces deux informations apparaissent primordiales pour valider « la théorie de la βc » dans la composition du site de liaison de l'Épo au niveau du SNC.

Au sein de l'équipe, nous avons donc recherché à caractériser l'expression de la βc dans le cerveau de rat, et à comparer cette expression avec celle de l'EpoR. Chez le rat adulte,

seuls de rares neurones expriment la  $\beta c$  alors qu'un important contingent neuronal exprime l'EpoR<sup>176</sup> (papier n°1). Or, cette faible représentativité de la  $\beta c$  ne peut être attribuée à un manque de sensibilité de la détection immunohistochimique de la  $\beta c$  puisque, à la suite du *SE*, nous avons montré avec le même protocole, que les cellules microgliales expriment fortement la  $\beta c$ , bien au-delà du seuil de détection<sup>176</sup>. Ainsi, ces observations indiquent que très peu de neurones sont susceptibles d'exprimer de manière concomitante l'EpoR et la  $\beta c$ . Même si nous ne pouvons exclure que l'Epo puisse protéger les neurones exprimant un ratio  $\beta c$ /EpoR très faible, via un nombre restreint de récepteurs EpoR/ $[\beta c]_2$ , nos résultats ne confortent pas l'hypothèse selon laquelle les effets neuroprotecteurs de l'Epo impliqueraient un tel récepteur. En effet, les interneurons du hile et les cellules pyramidales de CA1, qui expriment l'EpoR, mais pas la  $\beta c$ <sup>176</sup>, sont protégés par l'EpoRH dans divers modèles de neurodégénérescence<sup>40,176,207</sup> (papier n°2).

Afin de poursuivre notre investigation sur l'implication éventuelle de la  $\beta c$  dans les effets neurobiologiques de l'Epo, nous avons utilisé une autre approche expérimentale. Celle-ci est fondée sur l'hypothèse selon laquelle des gènes impliqués dans les mêmes mécanismes cellulaires devraient présenter des profils d'expression semblables dans le SNC. Nous avons ainsi comparé les variations d'expression des gènes *epo*, *epor* et  *$\beta c$*  dans plusieurs structures cérébrales chez le rat, soit à différents âges au cours de la vie postnatale, soit en réponse à des stimuli environnementaux. Nos résultats montrent que les importantes variations d'expression de l'EpoR, toujours corrélées positivement à celles de l'Epo, ne concordent jamais avec celles de la  $\beta c$  au cours du développement postnatal et du vieillissement (papier n°1), en réponse à trois expositions hypoxiques (papier n°2 et données non illustrées) et après 5 semaines d'hébergement dans la cage de milieu enrichi Marlau™ (données non illustrées).

L'ensemble de nos résultats convergent donc vers une invalidation de la « théorie de la  $\beta c$  » dans la composition du site de liaison de l'Epo et de ses dérivés dans le SNC. En outre, ces données sont corroborées par une étude récente *in vitro* qui démontre que l'activation de l'EpoR sauve les cellules PC12 et SH-SY5Y d'un stress cytotoxique, alors que ces cellules n'expriment pas la  $\beta c$ <sup>255</sup>. Il reste cependant fondamental de poursuivre les recherches sur l'identité exacte du site de liaison de l'Epo dans le SNC, afin de i) comprendre comment les dérivés de l'Epo exercent leurs effets neuroprotecteurs, sans stimuler l'hématopoïèse, et ii) de synthétiser d'autres dérivés de l'Epo présentant une plus grande affinité pour ces sites de liaison.

## **PARTIE II : EXPRESSION CEREBRALE DE L'EPOR AU COURS DU DEVELOPPEMENT ET DU VIEILLISSEMENT : ESPOIRS THERAPEUTIQUES & CRAINTES.**

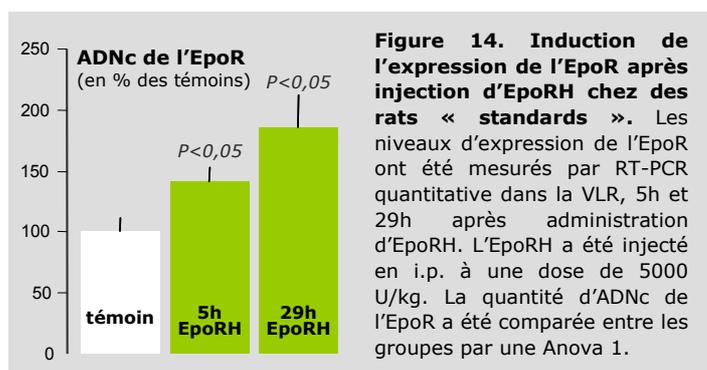
Le niveau d'expression de l'EpoR dans les neurones conditionne leur capacité de réponse à l'Epo<sup>33</sup> (papier n°2). Ainsi, les variations d'expression de l'EpoR au cours des périodes anténatale et postnatale<sup>126,146</sup>, indiquent que l'activité biologique du système Epoergique évolue tout au long de la vie. Dans notre étude approfondie de l'expression de l'EpoR et de l'Epo durant la vie postnatale, nous avons affiné les connaissances sur le patron d'expression de ces deux gènes, et découvert ainsi des espoirs thérapeutiques de l'EpoRH, malheureusement accompagnés de quelques craintes...

### ***II.1. L'EpoRH : pistes pour lutter contre la perte des capacités cognitives associée au vieillissement.***

Le vieillissement chez les humains et les animaux peut s'accompagner d'une diminution des capacités cognitives, l'une des plus redoutées par l'homme étant l'altération de la capacité de mémorisation. La mort des neurones<sup>86,120</sup>, et surtout la détérioration de la transmission synaptique<sup>172,173</sup>, sont les deux hypothèses privilégiées pour expliquer cette défaillance. Dans ce contexte, l'EpoRH apparaît comme un candidat neuroprotecteur intéressant. En effet, ses vertus neuroprotectrice<sup>22,92,154</sup>, neurotrophique<sup>26</sup> et facilitatrice de la LTP<sup>3</sup> pourraient contrecarrer les mécanismes biologiques responsables de la dégradation des capacités cognitives au cours du vieillissement. De plus, chez l'humain, une seule injection d'EpoRH à dose neuroprotectrice chez des sujets sains (âgés de 18-41 ans) améliore les performances mnésiques<sup>164,165</sup>. Dans une perspective d'étude des effets neurobiologiques de l'EpoRH au cours du vieillissement, il est nécessaire de s'assurer au préalable que l'EpoR est bien exprimé dans les neurones à des âges tardifs.

Chez le rat, le déclin des capacités cognitives débute dès le 12<sup>e</sup> mois, et s'accélère ensuite jusqu'au 24<sup>e</sup> mois<sup>232</sup>. Or, nous avons constaté que les niveaux d'expression de l'Epo et de l'EpoR sont plus élevés à l'âge de 12 mois qu'à l'âge adulte (3 mois), notamment au niveau des neurones de l'hippocampe. Cette augmentation de l'expression de l'EpoR pourrait compenser la diminution de l'expression cérébrale d'autres facteurs neurotrophiques, tel que le BDNF qui chute au cours du vieillissement<sup>93</sup>. Quoiqu'il en soit, l'activation du système EPOergique cérébral à cette étape clé du vieillissement ne semble pas être suffisante pour contrecarrer les mécanismes dégénératifs amorcés. Ainsi, à cet âge, il serait intéressant de tester les effets d'un traitement à l'EpoRH à dose

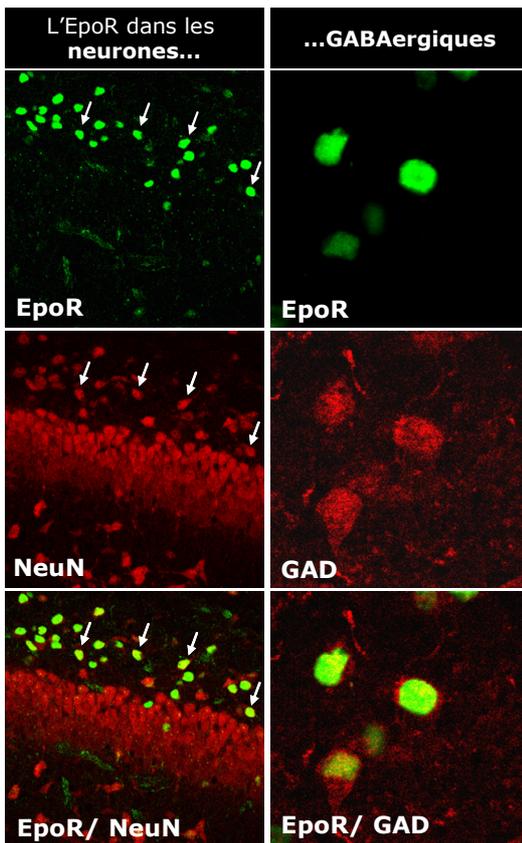
neuroprotectrice, sur les aptitudes cognitives des rats. En outre, l'expression de l'Epo dans l'hippocampe diminue fortement chez le très vieux rat (24-29 mois) <sup>41</sup>. Un apport exogène d'Epo à cet âge tardif pourrait non seulement pallier au déficit d'Epo endogène, mais aussi maintenir un niveau d'expression plus élevé d'EpoR dans le cerveau. En effet, nous avons récemment montré que quelques heures après une injection d'EpoRH chez le rat adulte (3 mois), le niveau d'expression de l'EpoR augmente dans la VLR (voir figure 14). Ces résultats corroborent ceux obtenus par Constance Noguchi et collaborateurs, qui démontrent *in vitro* que l'EpoRH augmente l'expression de l'EpoR dans des lignées cellulaires NT3 <sup>292</sup>. Cette stratégie permettrait non seulement de renforcer la robustesse intrinsèque des neurones, mais aussi de conserver une potentialité de réponse à l'EpoRH à des âges tardifs.



## **II.2. L'EpoRH chez les enfants prématurés: quelles conséquences neurobiologiques et cognitives ?**

L'EpoRH est aujourd'hui administrée aux enfants prématurés âgés de moins de 32 semaines afin de pallier à leurs anémies <sup>20</sup>. Chez ces enfants, le traitement à l'EpoRH réduit le nombre de transfusions sanguines et limite ainsi les risques de contamination <sup>28</sup>. Cependant, l'usage de cette molécule à cet âge précoce est préoccupant, puisque l'expression cérébrale de l'EpoR étant très importante durant la période périnatale, il est tout à fait envisageable que l'EpoRH ait un impact sur le développement du SNC.

Notre étude sur l'expression de l'EpoR au cours de la période périnatale chez le raton renseigne sur les cibles potentielles de l'Epo (endogène ou exogène) à cet âge. Le jeune raton présentant une grande immaturité du SNC, il peut être utilisé comme modèle expérimental d'enfant prématuré <sup>202</sup>. A l'âge de 5 jours, l'EpoR est fortement exprimé dans les interneurons GABAergiques (voir figure 15) aussi bien dans l'hippocampe que dans le néocortex. Or, au cours des deux premières semaines de vie, la plupart des interneurons GABAergiques migrent vers leur emplacement définitif, et meurent par MCA <sup>114,288</sup>. Eu égard les effets neurotrophiques et neuroprotecteurs du système Epoergique, il est envisageable que la forte diminution de l'expression de l'EpoR observée entre 2J et 14J contribue à la mort des interneurons GABAergiques. L'EpoRH administrée à des âges précoces serait alors susceptible d'interférer avec ce mécanisme



**Figure 15.** A l'âge de 5 jours chez le raton, les neurones exprimant fortement l'EpoR dans la *stratum oriens* de l'hippocampe sont GABAergiques.

naturel, en modifiant la survie et la migration des interneurones GABAergiques. Dans l'éventualité d'une MCA différée de ces interneurones, l'équilibre des réseaux excitateurs/ inhibiteurs dans le cerveau pourrait être perturbé à court et à long terme.

Depuis 2 ans, nous avons démarré un projet de recherche visant à étudier les conséquences cognitives à court et long terme du traitement à l'EpoRH chez le jeune raton (de 5J à 10J). Les premiers résultats montrent que i) l'administration systémique de plusieurs injections d'EpoRH à 5J n'a pas d'incidence sur la mortalité, corroborant ainsi les observations effectuées dans deux études cliniques <sup>116,188</sup>, et ii) l'EpoRH injectée par voie systémique traverse rapidement la barrière hémato-encéphalique pour se retrouver en grande quantité dans le tissu cérébral. Nous avons ensuite étudié, à l'aide de tests comportementaux, les effets du traitement à

l'EpoRH au plus jeune âge, sur l'anxiété et les capacités d'apprentissage et de mémorisation à l'âge adulte. Nous n'avons observé aucune altération des capacités mnésiques chez les rats traités. En revanche, ces animaux présentent une nette réduction de leur anxiété. Actuellement, nous étudions les mécanismes cellulaires et moléculaires qui pourraient soutenir ces modifications cognitives, notamment par des analyses histologiques et transcriptomiques des cerveaux de ces animaux.

## **PARTIE III : AUGMENTER L'EXPRESSION NEURONALE DE L'EPOR:**

### **NOUVELLE STRATEGIE POUR AMELIORER LES EFFETS**

### **NEUROPROTECTEURS DE L'EPORH.**

#### ***III.1. Régulations géniques de l'EpoR***

L'expression cérébrale de l'EpoR est augmentée dans de multiples situations physiopathologiques chez l'humain et chez l'animal (voir paragraphe IV.2.h.a de l'état de l'art). En outre, une étude a montré qu'il était possible d'élever la concentration cérébrale d'EpoR chez des souris, en les exposant à des températures chaudes (34°C) pendant un mois <sup>220</sup>. Ces divers résultats indiquent que l'expression de l'EpoR est modulable en

réponse à divers stimuli, et nous ont donc encouragé à rechercher des conditions environnementales non délétères capables de réveiller l'expression de l'EpoR dans les neurones.

Nous avons montré pour la première fois *in vivo*, que la répétition des séances hypoxiques, l'enrichissement du milieu de vie, ou la combinaison des deux, sont des manipulations environnementales qui permettent de « réveiller » le phénotype EpoR dans les neurones (papier n°2). En outre, il est particulièrement intéressant de constater qu'un même stimulus environnemental (ici, les séances d'hypoxies) n'entraîne pas les mêmes régulations du gène *epor* suivant que les animaux sont hébergés en milieu standard ou en milieu enrichi. Par exemple, en réponse à 3 hypoxies, l'expression de l'EpoR dans l'hippocampe ne varie pas chez les animaux « standard », alors qu'elle augmente fortement chez les animaux « enrichi ». De plus, dans le néocortex, l'augmentation de l'EpoR n'est possible que lorsque les animaux sont hébergés dans le milieu enrichi et exposés aux séances hypoxiques. Ces deux exemples illustrent la grande complexité des mécanismes de régulation génique qui semblent dépendre de la structure cérébrale et du stimulus environnemental.

D'après des études *in vitro*, la régulation du gène *epor* est dépendante de l'activité du facteur de transcription GATA-3, lui-même activé par l'Epo<sup>292</sup>; suggérant un contrôle de l'expression de l'EpoR par l'Epo. Cette théorie, tout à fait probable puisque l'Epo et l'EpoR sont exprimés dans les mêmes cellules neurales, est corroborée par plusieurs de nos résultats: i) en réponse à 3 hypoxies, l'induction de l'EpoR a lieu dans la VLR, région où l'augmentation d'Epo est la plus importante, ii) les inductions d'EpoR observées chez les animaux « enrichis » concordent systématiquement avec des augmentations d'expression de l'Epo, et iii) chez des animaux « standards », l'EpoRH active l'expression du gène *epor* 5h et 29h après son administration (voir figure 14). En revanche, il est intrigant que des niveaux d'induction d'Epo identiques n'engendrent pas forcément une élévation de l'expression de l'EpoR. Par exemple, dans le néocortex (papier n°2), les niveaux d'induction de l'Epo en réponse à trois hypoxies sont similaires dans les deux conditions d'hébergement, alors que l'expression de l'EpoR n'est augmentée que lorsque les animaux « enrichis » sont exposés aux séances hypoxiques. Ces résultats suggèrent donc que la « sur-activation » du gène *epor* ne passe pas exclusivement par l'Epo, mais qu'elle implique également d'autres mécanismes de régulation génique. Afin de progresser dans la compréhension de ces mécanismes, il est essentiel de rechercher des modifications épigénétiques qui pourraient être responsables d'une amélioration de la transcription de l'*epor*. Les changements de conformation de la chromatine font partie des régulations épigénétiques à cibler. En effet, l'enrichissement du milieu de vie augmente la transcription de nombreux gènes en favorisant l'acétylation des histones,

connue pour modifier la conformation chromatinienne <sup>72</sup>. Il est donc envisageable que chez les animaux hébergés dans la cage Marlau ce type de modification épigénétique puisse faciliter la transcription du gène *epor*.

Aujourd'hui, même si nous n'avons pas encore élucidé les mystères de la régulation génique de l'EpoR, nous avons découvert une panoplie de stimuli environnementaux capables d'augmenter l'expression neuronale de l'EpoR dans plusieurs régions du cerveau. Armés de cette panoplie, nous avons désormais la possibilité de cibler le réveil du phénotype neuronal EpoR dans des structures cérébrales.

### **III.2. Le niveau d'expression neuronale de l'EpoR conditionne la réponse à l'EpoRH**

La VLR, région cérébrale qui exprime le plus faible niveau d'EpoR, est non seulement la plus vulnérable aux atteintes excitotoxiques, mais aussi la moins répondante au traitement à l'EpoRH (papiers n°2-3). En effet, dans notre modèle de SE, l'EpoRH protège efficacement les neurones de l'hippocampe, mais est inefficace pour sauver les neurones de la VLR. L'observation des stratégies de défense endogène du SNC face aux agressions cérébrales nous renseigne sur les raisons éventuelles de l'inefficacité de l'EpoRH. En effet, en réponse à une agression, le SNC active le système protecteur Epoergique en augmentant, non seulement l'expression de l'Epo mais, aussi, celle de l'EpoR. Stuart Lipton parle alors de l'Epo comme une molécule activée par la pathologie (PAT, pour *pathologically activated therapeutics*), c'est-à-dire que l'augmentation de la quantité de récepteur cible de l'Epo permet à cette molécule d'être active <sup>145</sup>. Nos résultats sont en accord avec ce concept puisqu'ils montrent que le seul moyen d'obtenir de puissants effets neuroprotecteurs de l'EpoRH dans la VLR, est d'augmenter au préalable l'expression de l'EpoR dans les neurones par les séances hypoxiques. Notre étude est donc la première à mettre en évidence que l'augmentation de la quantité d'un récepteur dans les neurones est un pré-requis à tout effet neuroprotecteur de son ligand.

Au regard des effets neuroprotecteurs de l'EpoRH dans cette condition, nous pensons que le réveil phénotypique de l'EpoR dans les neurones s'est traduit par une augmentation de la quantité d'EpoR adressé à la membrane plasmique. Des études *in vitro* ont montré que, dans les conditions basales, la présence de l'EpoR sur la membrane plasmique est faible. En effet, l'EpoR se concentre principalement dans le réticulum endoplasmique <sup>106</sup>, où des mécanismes de maturation de l'EpoR favorisent son adressage à la membrane. L'élégante étude de Ravid et collaborateurs a montré que les propriétés de maturation de l'EpoR chez le rat taupe, animal adapté à un environnement hypoxique (voir paragraphe IV.2.d. de l'Etat de l'art), favorisent la migration du récepteur vers la membrane

plasmique <sup>197</sup>. Ainsi, dans notre modèle de répétition des séances hypoxiques, il est envisageable que des modifications post-traductionnelles de la protéine EpoR aient assuré un meilleur adressage du récepteur vers la membrane plasmique. L'étude de ces éventuelles modifications post-traductionnelles est difficile à aborder *in vivo*. En revanche, il serait possible de mesurer *in vivo* la présence de l'EpoR à la surface des neurones à la suite des expositions hypoxiques en détectant, par micro-TEP (Tomographie par Emission de Positons), un ligand Epo radiomarqué.

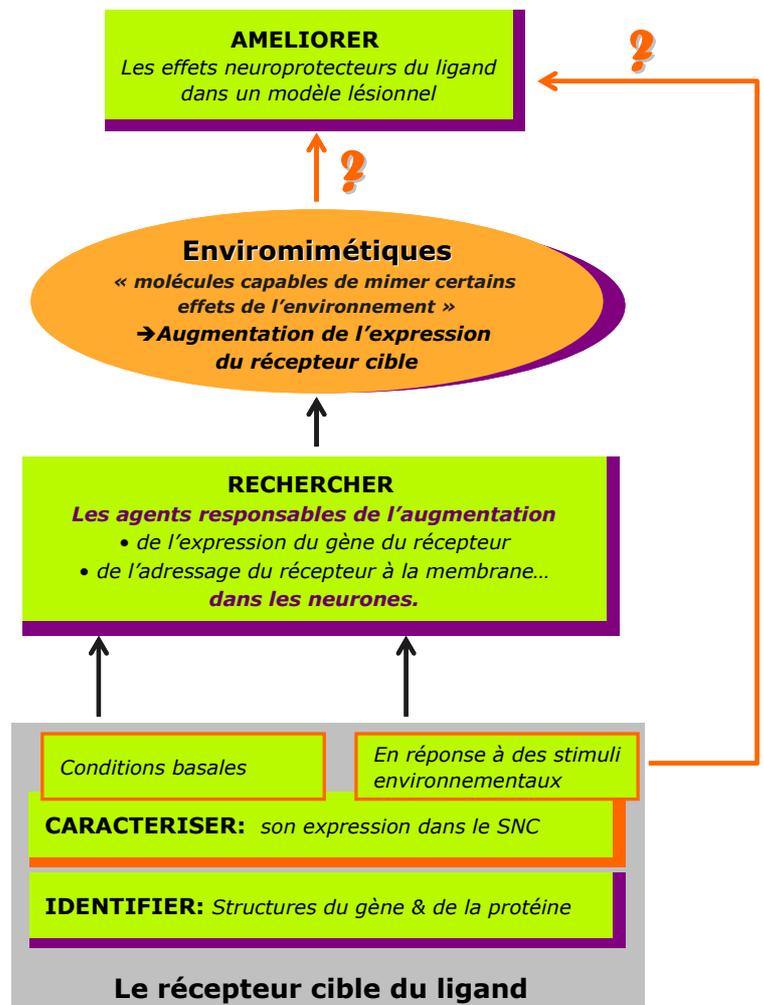
## **PARTIE IV : A LA RECHERCHE DES « ENVIROMIMETIQUES »**

### **ACTIVATEUR DE L'EXPRESSION DES RECEPTEURS CIBLES**

La recherche dans le domaine de la neuroprotection peut se réjouir. Aujourd'hui, un grand nombre de molécules sont capables de sauver les neurones...des animaux. Et c'est ici que réside tout le problème ! Alors qu'une pléthore de molécules montre de puissants effets neuroprotecteurs dans les études pré-cliniques elles sont, dans leur grande majorité, inefficaces chez l'humain. Dans une récente revue, Alan Faden propose plusieurs explications d'ordre méthodologique à cet échec <sup>69</sup>, auxquelles nous souhaiterions rajouter des limites conceptuelles. La recherche en neuroprotection doit innover, non pas tant dans les molécules ciblées, mais plutôt dans la stratégie mise en place pour améliorer les actions biologiques de ces molécules. Nos travaux sur les effets neuroprotecteurs du système Epoergique s'inscrivent dans cette démarche, et ont conduit au concept suivant : *les effets neuroprotecteurs d'une molécule dépendent de la localisation cellulaire et subcellulaire de son récepteur cible et du niveau d'expression de ce dernier*. En s'appuyant sur ce concept, nous proposons un cadre théorique (voir figure 16) décrivant les principales étapes de recherche qui ont pour objectif de conduire à l'optimisation des effets neurobiologiques d'un ligand.

Nous pensons que dans le cadre des études pré-cliniques, chez l'animal, et cliniques, chez l'humain, il est fondamental d'étudier le récepteur cible du ligand à tester. En effet, le fait qu'un même ligand soit efficace chez l'animal et inefficace chez l'humain pourrait s'expliquer par un patron d'expression du récepteur cible respectivement favorable ou défavorable aux effets biologiques du ligand. Il est donc crucial de se renseigner sur les localisations tissulaire, cellulaire et intracellulaire des récepteurs cibles d'un ligand, tant dans les conditions basales, qu'en réponse à une agression cérébrale.

L'exposition de l'organisme à des stimuli environnementaux représente une stratégie pour améliorer l'efficacité d'une molécule neuroprotectrice, via l'augmentation de la quantité de son récepteur cible à la surface des neurones. Ces recherches pourraient conduire à explorer les bénéfices de la combinaison entre l'administration d'une molécule et une thérapie environnementale chez des patients à risques et/ ou atteints d'une neuropathologie chronique (maladies d'Alzheimer, de Parkinson, syndrome épileptique). Cependant, cette stratégie thérapeutique présente deux limites majeures. Premièrement, il est possible que certains effets physiologiques des stimuli environnementaux soient néfastes pour le patient. Deuxièmement, cette stratégie n'est pas applicable dans le cadre d'accidents neurologiques (un traumatisme crânien, une ischémie cérébrale, un Status Epilepticus...), puisqu'il est nécessaire d'administrer la molécule en urgence. Pour l'ensemble de ces raisons, rechercher des molécules capables de mimer les effets bénéfiques d'un environnement représente un véritable espoir thérapeutique. Cette classe d'agent thérapeutique, appelé « enviromimétique »<sup>186</sup>, existe déjà en ce qui concerne les ligands. Par exemple, l'EpoRH est un « enviromimétique », puisqu'il reproduit partiellement les effets d'un environnement hypoxique. En revanche, il n'existe pas encore d'agents pharmacologiques capables d'activer l'expression de récepteurs cibles tels que l'EpoR. L'administration de ce type d'« enviromimétique » permettrait pourtant, par l'augmentation de l'expression de l'EpoR de potentialiser les effets d'un traitement à l'EpoRH. Afin de trouver cet « enviromimétique », il est nécessaire de comprendre les mécanismes par lesquels les stimuli environnementaux, tels que la répétition des séances hypoxiques et l'enrichissement du milieu de vie, augmentent la présence de l'EpoR à la surface des neurones.

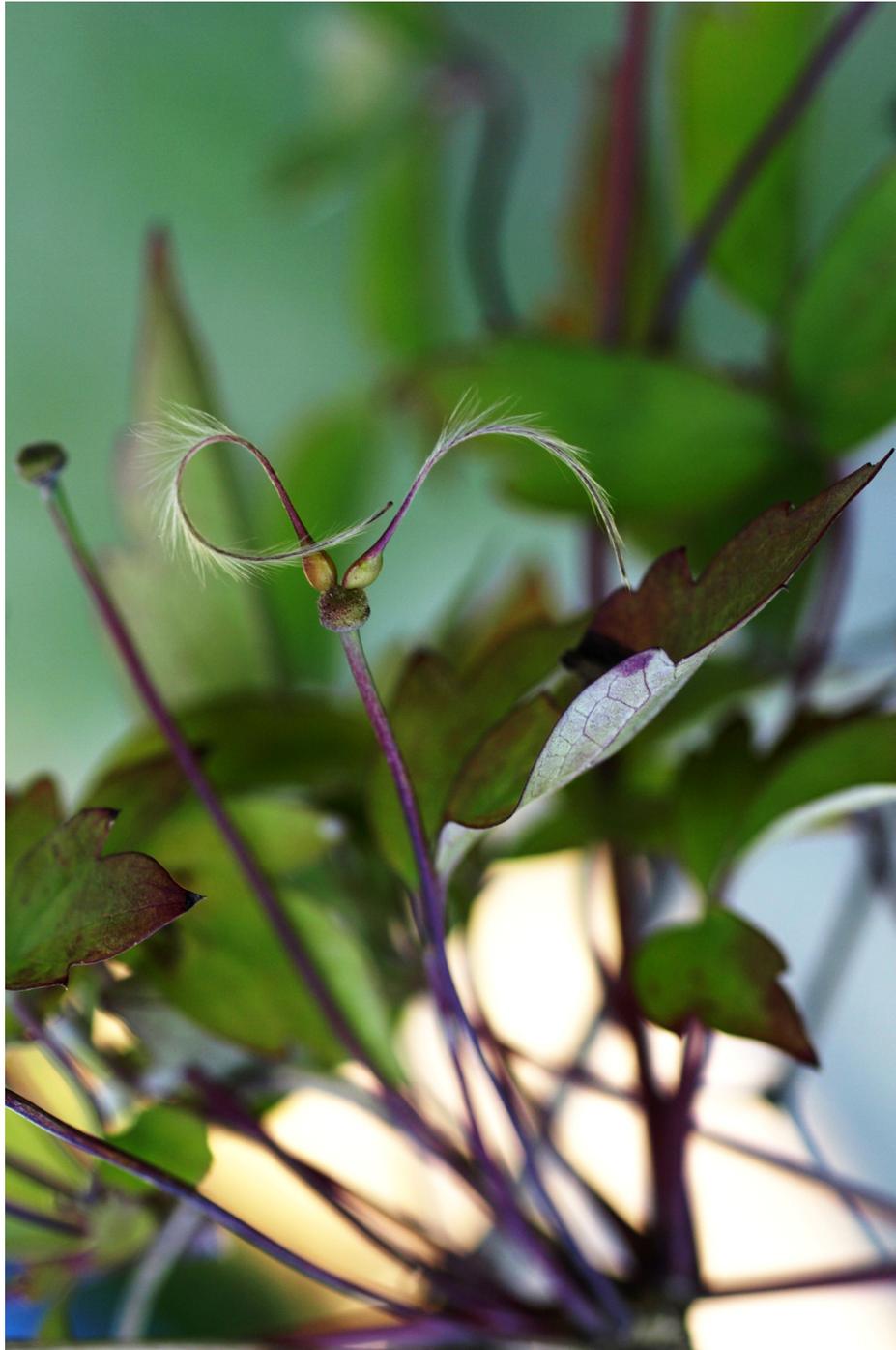


**Figure 16. Proposition d'une démarche pour la recherche de molécules « enviromimétiques ».**

Avant de réaliser l'ensemble des étapes de cette démarche, il est au préalable crucial de s'assurer que le stimulus environnemental, qui augmente l'expression du récepteur cible dans les cellules d'intérêts (par exemple les neurones), améliore les effets neuroprotecteurs du ligand. Une fois cette étape validée, la recherche des mécanismes par lesquels le récepteur cible est augmenté, doit aboutir à la synthèse de composés enviromimétiques. Enfin, ces composés doivent être validés par la vérification de leur capacités, une fois administrés, i) à augmenter l'expression du récepteur cible dans le SNC et ii) à améliorer les effets neuroprotecteurs du ligand.

## Conclusions & Perspectives

---

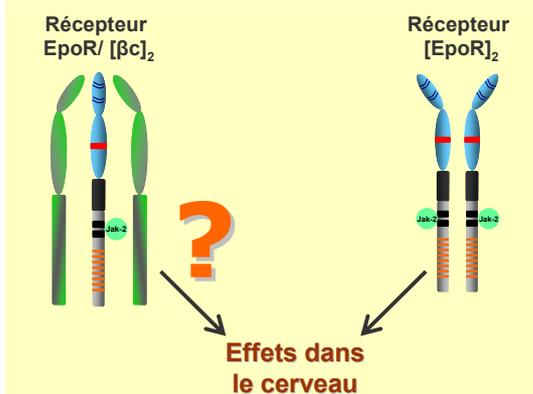
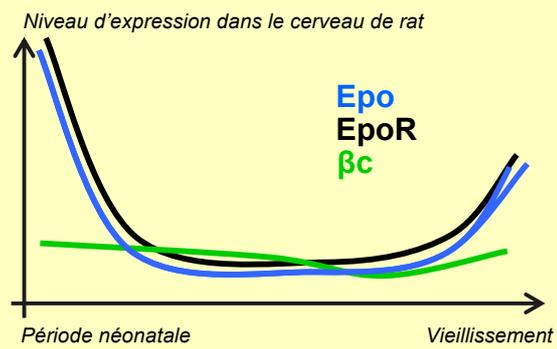
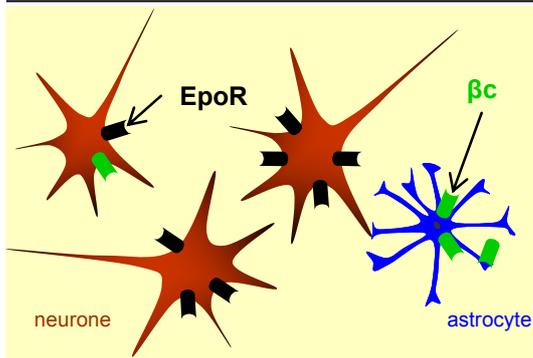


*Harmonie*, de Frédérique Cohen-Adad.

## CONCLUSIONS ILLUSTRÉE

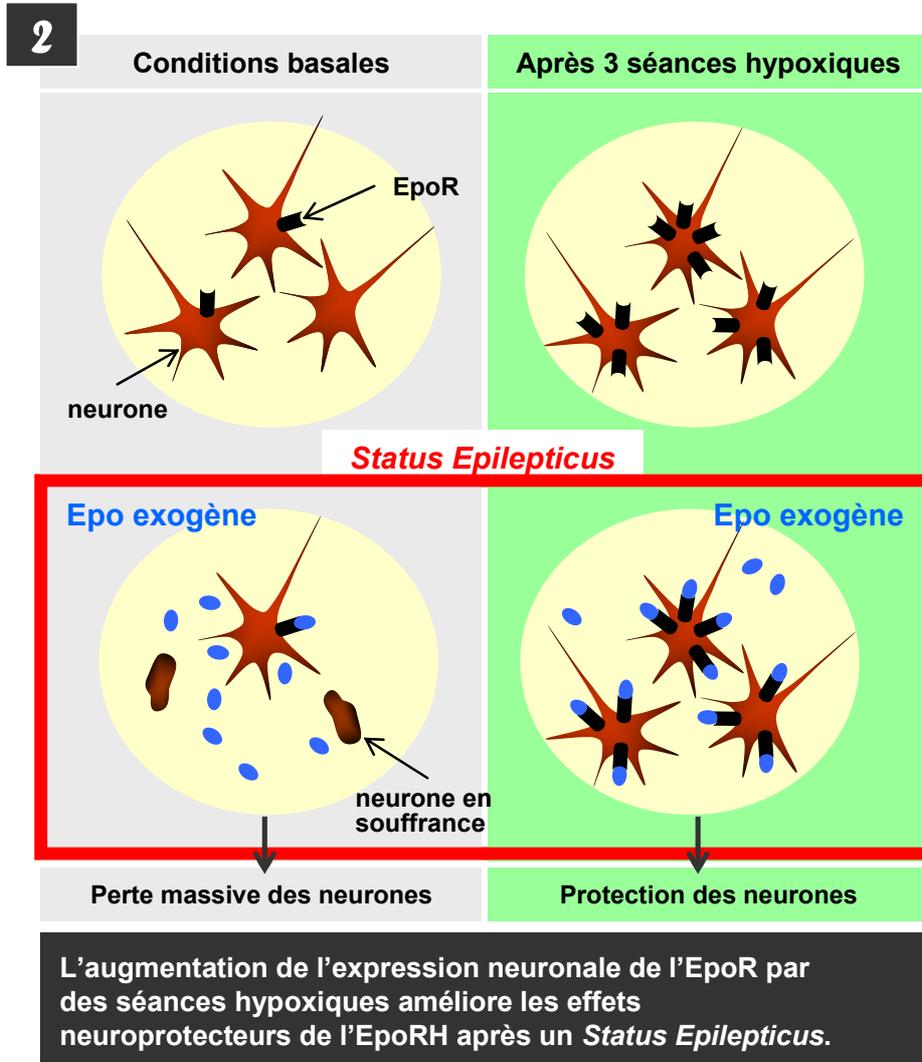
1

Présence de l'EpoR, de l'Epo et de la  $\beta c$  dans le cerveau de rat au cours de la vie postnatale



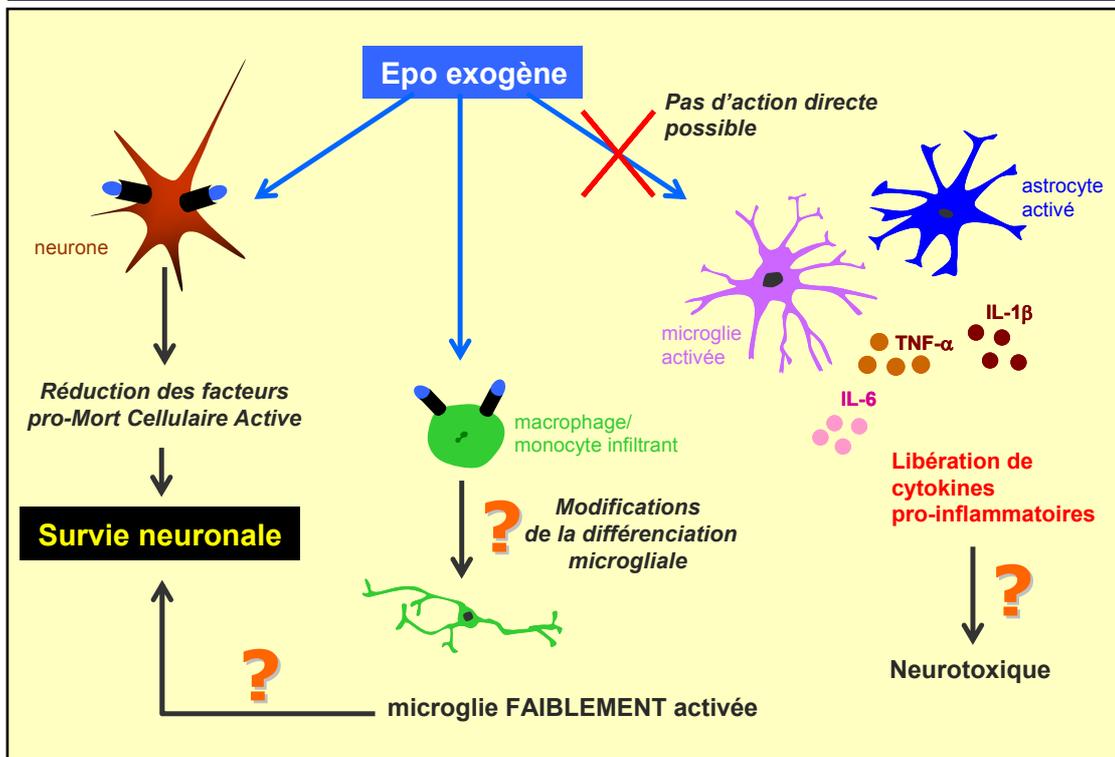
Au cours de la vie postnatale: 1) de très rares neurones expriment la  $\beta c$  et l'EpoR de manière concomitante, et 2) l'expression de l'EpoR, fortement corrélée à celle de l'Epo, n'est jamais concordante avec celle de la  $\beta c$ .

Il est ainsi peu probable que la  $\beta c$  fasse partie du récepteur responsable des effets neurobiologiques de l'Epo



3

Effets de l'EpoRH sur les cellules du SNC dans la phase précoce post-*Status Epilepticus*



Les effets neuroprotecteurs de l'EpoRH ne sont associés à une réduction dans la phase précoce post-*Status Epilepticus* (SE), ni de l'expression cérébrale des cytokines pro-inflammatoires, ni du nombre de monocytes/ macrophages infiltrants. En revanche, le fait que l'expression des « gènes de survie » et des « gènes de mort » diminue dans cette condition neuroprotectrice, indique qu'en agissant directement sur les neurones, l'EpoRH réduirait la souffrance neuronale. Enfin, dans la région limbique ventrale (VLR), la neuroprotection est associée à une forte réduction de la microgliose réactionnelle. Sachant que les monocytes/ macrophages expriment fortement l'EpoR dans le parenchyme cérébral, il est possible que l'EpoRH, dans un contexte de neuroprotection, ait modifié la différenciation microgliale de ces cellules infiltrantes.

## PERSPECTIVES

### I. Effets de l'EpoRH sur les monocytes/ macrophages infiltrant le parenchyme cérébral à la suite du SE.

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle l'EpoRH administrée après le SE pourrait modifier le devenir des monocytes/ macrophages une fois qu'ils ont infiltré le parenchyme cérébral (voir papier n°3), nous mettons actuellement au point une technique pour tracer les monocytes/ macrophages dans le cerveau. En effet, à la suite du SE, nous détectons les monocytes/ macrophages dans le tissu cérébral exclusivement pendant la phase précoce (2 jours) (papier n°3). Il semble donc qu'au cours de leur différenciation en cellule microgliale, les monocytes/ macrophages perdent, d'une part leur immunoréactivité au cd-14 et, d'autre part, leur chaîne de sulfate d'héparane.



Autorisé par Christian Raemy©

Ainsi, le seul moyen dont nous disposons pour suivre ces monocytes/ macrophages dans le cerveau est de les marquer avec un traceur indéfectible. Un des principaux sujets de discordance dans le domaine des cellules infiltrantes réside dans les modèles développés pour suivre leur devenir dans le tissu cérébral (voir paragraphe III.2.b de l'état de l'art). Dans l'équipe, nous avons choisi un modèle qui consiste à injecter, à la suite du SE, des monocytes/ macrophages préalablement marqués *in vitro*. Pour ce faire, nous utiliserons la cytométrie de flux pour isoler les monocytes/ macrophages contenus dans le sang frais de rat. Puis, les cellules seront incubées avec des nanoparticules d'oxyde de fer super-paramagnétiques (Endorem™). Une fois phagocytées par les monocytes/ macrophages, ces nanoparticules nous serviront de traceur. Les monocytes marqués seront injectés en grande quantité par voie intraveineuse dès la fin du SE, et seront ainsi susceptibles d'infiltrer le parenchyme cérébral. Ce modèle nous permettra donc de détecter les nanoparticules présents dans les monocytes/ macrophages du SNC à différentes périodes après le SE, en utilisant la technique de Perls en histologie. Etant donné que les monocytes/ macrophages infiltrants expriment l'EpoR (voir papier n°3), nous souhaitons étudier les effets de l'EpoRH (avec ou sans stimulus environnemental) sur le devenir de ces monocytes/ macrophages dans le SNC.

## **II. Conséquences fonctionnelles de la neuroprotection par l'EpoRH associée au milieu enrichi.**

Le *Status Epilepticus* (*SE*) induit par la pilocarpine engendre des lésions cérébrales très étendues. Ce modèle est approprié pour la recherche de stratégies neuroprotectrices visant à optimiser les effets bénéfiques des agents pharmacologiques. Par exemple, nous avons montré que si l'administration d'EpoRH est suffisante pour protéger une grande partie des neurones de l'hippocampe (Nadam 2007) (papier n°2-3), l'induction de l'expression neuronale de son récepteur EpoR est nécessaire pour que l'EpoRH soit neuroprotectrice dans la région limbique ventrale (VLR). Toutefois, dans ce modèle, aucune de nos stratégies de neuroprotection n'a permis de protéger le thalamus. Or, la persistance de phénomènes neurodégénératifs massifs dans cette région cérébrale compromet l'étude des effets fonctionnels associés à la neuroprotection des autres territoires cérébraux. En effet, bien que l'EpoRH ait protégé un grand nombre de neurones dans l'hippocampe et la VLR, aucune amélioration, ni de la capacité d'apprentissage, ni de l'ictiogenèse (données non montrées) n'a été observée; ces troubles fonctionnels étant peut-être générés par la perte des neurones du thalamus dorsal. Ainsi, afin d'étudier non seulement la cytoprotection, mais aussi la fonction cérébrale, il est nécessaire de se rapprocher de modèles d'atteintes cérébrales associés à des processus de neurodégénérescence moins sévères.

Pour évaluer les améliorations fonctionnelles associées à la neuroprotection, nous testerons nos stratégies neuroprotectrices dans des modèles où la neurodégénérescence est plus localisée et plus progressive: le modèle de *SE* non convulsivant de Robert Sloviter, et deux modèles de traumatisme crânien. Etant donné que ces modèles n'affectent pas la VLR, mais plutôt l'hippocampe, nous avons choisi d'utiliser l'hébergement dans Marlau™, pour augmenter spécifiquement l'expression de l'EpoR dans cette structure (papier n°2).

**Le modèle de *SE* non convulsivant** développé par Robert Sloviter, consiste à stimuler électriquement la voie perforante pendant 24 heures chez un rat vigile, provoquant une perte lente et sélective des neurones de l'hippocampe. Dans ce modèle, les rats développent des crises épileptiques spontanées quelques jours après la stimulation (données non publiées). Au laboratoire, nous transférons actuellement cette technique avec l'aide de Robert Sloviter. Notre étude consistera à augmenter l'expression de l'EpoR dans l'hippocampe en hébergeant pendant plusieurs semaines les rats dans la cage Marlau™, puis à administrer l'EpoRH à la suite de la stimulation électrique. Nous testerons notre stratégie de neuroprotection en étudiant ses effets i) neuroprotecteurs

dans l'hippocampe, ii) anti-épileptogène et anti-épileptique, et iii) sur les performances d'apprentissage et de mémorisation.

**Les modèles de traumatisme crânien** choisis sont les modèles i) de percussion latérale avec un fluide directement sur la dure-mère (*Lateral Fluid Percussion LFP*), et ii) de percussion de la boîte crânienne avec un poids (*Weight Drop Closed Head Injury WDCHI*). Ces deux procédés induisent des lésions cérébrales bien distinctes : i) Le modèle de **LFP** provoque une lésion primaire induite par l'impact mécanique, suivie d'une lésion secondaire orchestrée par l'activation des mécanismes de la Mort Cellulaire Active. ii) Le modèle de **WDCHI** génère un mouvement du cerveau dans la boîte crânienne, responsable de lésion axonale diffuse. Dans ces deux modèles, notre stratégie de neuroprotection (hébergement dans la cage Marlau™ associé à l'EpoRH) vise à contrecarrer les lésions secondaires, étant donné que la lésion primaire reste irrémédiable. Nous évaluerons les effets de la cage Marlau™ et du traitement à l'EpoRH d'une part sur la protection des neurones/ axones, et d'autre part sur les performances cognitives (apprentissage/ mémorisation, émotions) et motrices des rats.

En outre, les grands remaniements moléculaires et cellulaires à la suite de ces traumatismes crâniens seraient susceptibles de rendre le tissu cérébral hyperexcitable, c'est-à-dire plus enclin à développer des crises épileptiques. Or, il est tout à fait envisageable que notre stratégie de neuroprotection puisse modifier cette transformation du tissu cérébral. Afin de tester cette hypothèse, nous étudierons la sensibilité des animaux soumis à un traumatisme crânien au protocole de *kindling*, qui consiste à stimuler électriquement de manière répétée certaines régions cérébrales pour générer une augmentation progressive de l'excitabilité neuronale.

# Abbréviations

---

## A

<b>aa</b> :	acide aminé
<b>Ac</b> :	anti-corps
<b>ADN</b> :	acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b> :	acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>ADNg</b> :	acide désoxyribonucléique génomique
<b>ANOVA I</b> :	analyse de variance à 1 facteur
<b>ANOVA II</b> :	analyse de variance à 2 facteurs
<b>ARNm</b> :	acide ribonucléique messenger

## B

<b>βc</b> :	chaîne Beta commune aux récepteurs de l'IL-6, l'IL-3 et du GM-CSF
<b>BCA</b> :	acide bicinchoninique
<b>BDNF</b> :	facteur neurotrophique dérivé du cerveau
<b>BHE</b> :	barrière hémato-encéphalique
<b>BSA</b> :	albumine de sérum bovine

## C

<b>CA</b> :	corne d'Ammon
<b>CA1</b> :	région 1 de la corne d'Ammon
<b>CA2</b> :	région 2 de la corne d'Ammon
<b>CA3</b> :	région 3 de la corne d'Ammon
<b>CD11b</b> :	marqueur de cellule immuno-compétente (pour « cluster of differentiation 11b »)
<b>CD14</b> :	marqueur de cellule myéloïde (pour « cluster of differentiation 14 »)

## D

<b>DAB</b> :	diaminobenzidine
<b>dNTP</b> :	désoxynucléotide tri-phosphate
<b>DO</b> :	densité optique

## E

<b>ELISA</b> :	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
<b>Epo</b> :	érythropoïétine
<b>EpoR</b> :	récepteur de l'érythropoïétine
<b>EpoRH</b> :	érythropoïétine recombinante humaine
<b>ERK</b> :	Kinases à signalisation régulée par le milieu extracellulaire

## G

<b>GABA</b> :	acide gamma-amino butyrique
<b>GAPDH</b> :	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<b>GD</b> :	gyrus denté
<b>GFAP</b> :	protéine acide fibrillaire d'origine gliale
<b>GFP</b> :	protéine autofluorescente verte (pour « green »)
<b>GM-CSF</b> :	facteur stimulant les colonies des macrophages-granulocytes

## H

<b>Hi</b> :	hippocampe
<b>HS</b> :	sulfate d'héparane

## I

<b>IκB</b> :	molécule inhibitrice du facteur de transcription NFκB
<b>IA</b> :	coordonnées interaurales

<b>IGF :</b>	facteur de croissance (pour « growth ») de l'insuline
<b>IgG :</b>	immunoglobuline G
<b>IL-1 :</b>	interleukine-1
<b>IL-1<math>\alpha</math> :</b>	interleukine-1 $\alpha$
<b>IL-1<math>\beta</math> :</b>	interleukine-1 $\beta$
<b>IL-6 :</b>	interleukine-6
<b>IL-6R :</b>	récepteur de l'interleukine-6
<b>IL-1Ra :</b>	antagoniste naturel des récepteurs de l'interleukine-1
<b>IL-1RI :</b>	récepteur de type I de l'interleukine-1
<b>IL-1RII :</b>	récepteur de type II de l'interleukine-1
<b>i.c.v :</b>	voie d'injection intra-cérébroventriculaire
<b>i.p :</b>	voie d'injection intra-péritonéale
<b>i.v :</b>	voie d'injection intra-veineuse

**J**

<b>J :</b>	jour
<b>JAK :</b>	janus kinase
<b>JNK:</b>	jun-kinases

**K**

<b>kDa :</b>	kilodalton
<b>kg :</b>	kilogramme
<b>KO :</b>	knock out

**M**

<b>MAPK :</b>	famille des protéines kinases à activité mitogène
<b>MCP-1 :</b>	protéine de type 1 du chimiotactisme des monocytes
<b>MIP-1<math>\alpha</math> :</b>	protéine inflammatoire de type 1 $\alpha$ des macrophages
<b>MIP-1<math>\beta</math> :</b>	protéine inflammatoire de type 1 $\beta$ des macrophages
<b>mL :</b>	millilitre
<b>mUI :</b>	milliunités internationales
<b>n :</b>	nombre d'animaux par groupe
<b>NC :</b>	néocortex
<b>NeuN :</b>	marqueur spécifique de neurone (pour « neuronal nuclei »)
<b>NF<math>\kappa</math>B :</b>	facteur de transcription nucléaire de la chaîne légère $\kappa$ des lymphocytes B
<b>ng :</b>	nanogramme
<b>NGF :</b>	facteur de croissance (pour « growth ») des nerfs
<b>nM :</b>	nanomolaire

**P**

<b>pb :</b>	paire de base
<b>PB :</b>	tampon phosphate
<b>PBS :</b>	tampon phosphate salin
<b>PBS-T :</b>	tampon phosphate salin avec 0,3% de triton x100
<b>PBS-T-D :</b>	tampon phosphate salin avec 0,3% de triton x100 et 2% de sérum normal d'âne
<b>PC12 :</b>	lignée cellulaire dérivée de cellules chromaffines surrenaliennes (pour « phéochromocytome »)
<b>PCR :</b>	réaction de polymérisation en chaîne
<b>PF :</b>	paraformaldéhyde
<b>PI3K :</b>	phosphoinositide-3-kinase
<b>Pilo-SE :</b>	status epilepticus induit par l'administration de pilocarpine
<b>pM :</b>	picomolaire

**R**

<b>RT-PCR :</b>	réaction de rétro-transcription (ou « transcription inverse ») suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne
-----------------	--

**S**

<b>s.c</b> :	voie d'injection sous-cutanée
<b>SE</b> :	status epilepticus
<b>sec</b> :	seconde
<b>SEM</b> :	erreur standard sur la moyenne
<b>SNC</b>	système nerveux central
<b>STAT</b> :	famille des transducteurs de la signalisation et activateurs de la transcription

**T**

<b>TA</b> :	température ambiante
<b>TG</b> :	transgénique
<b>T<sub>m</sub></b> :	température de fusion
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> :	facteur de nécrose tumorale $\alpha$
<b>TNF-<math>\beta</math></b> :	facteur de nécrose tumorale $\beta$
<b>TNF-RI</b> :	récepteur de type I de facteur de nécrose tumorale
<b>TNF-RII</b> :	récepteur de type II de facteur de nécrose tumorale

**U**

<b>UI</b> :	unité internationale
<b>UP</b> :	eau ultra pure
<b>UV</b> :	ultraviolets

**V**

<b>VEGF</b> :	facteur de croissance (pour « growth ») des cellules endothéliales vasculaires
<b>VLR</b> :	région limbique ventrale
<b><math>\mu</math>g</b> :	microgramme
<b><math>\mu</math>L</b> :	microlitre
<b><math>\mu</math>m</b> :	micromètre
<b><math>\mu</math>M</b> :	micromolaire

# Références bibliographiques

---

## A

1. Abbott, N.J., Ronnback, L. & Hansson, E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* **7**, 41-53 (2006).
2. Acharya, M.M., Hattiangady, B. & Shetty, A.K. Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy. *Prog Neurobiol* **84**, 363-404 (2008).
3. Adamcio, B., *et al.* Erythropoietin enhances hippocampal long-term potentiation and memory. *BMC Biol* **6**, 37 (2008).
4. Agnello, D., *et al.* Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Research* **952**, 128-134 (2002).
5. Ajami, B., Bennett, J.L., Krieger, C., Tetzlaff, W. & Rossi, F.M. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci* **10**, 1538-1543 (2007).
6. Alafaci, C., *et al.* Effect of recombinant human erythropoietin on cerebral ischemia following experimental subarachnoid hemorrhage. *Eur J Pharmacol* **406**, 219-225 (2000).
7. Allan, S.M., Tyrrell, P.J. & Rothwell, N.J. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol* **5**, 629-640 (2005).
8. Araujo, I.M., *et al.* Calpain activation is involved in early caspase-independent neurodegeneration in the hippocampus following status epilepticus. *J Neurochem* **105**, 666-676 (2008).
9. Assaraf, M.I., *et al.* Brain erythropoietin receptor expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **66**, 389-398 (2007).
10. Auvergne, R., *et al.* Delayed kindling epileptogenesis and increased neurogenesis in adult rats housed in an enriched environment. *Brain Research* **954**, 277-285 (2002).

## B

11. Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S. & Schettini, G. Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J Neurochem* **82**, 1311-1329 (2002).
12. Banks, W.A., Jumbe, N.L., Farrell, C.L., Niehoff, M.L. & Heatherington, A.C. Passage of erythropoietic agents across the blood-brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. *European Journal of Pharmacology* **505**, 93-101 (2004).
13. Bechmann, I., *et al.* Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *European Journal of Neuroscience* **14**, 1651-1658 (2001).
14. Belayev, L., *et al.* Neuroprotective effect of darbepoetin alfa, a novel recombinant erythropoietic protein, in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **36**, 1071-1076 (2005).
15. Ben-Ari, Y., Lagowska, J., Tremblay, E. & Le Gal La Salle, G. A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. *Brain Res* **163**, 176-179 (1979).
16. Bernardino, L., *et al.* Modulator effects of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *Journal of Neuroscience* **25**, 6734-6744 (2005).
17. Bernaudin, M., *et al.* Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* **30**, 271-278 (2000).

18. Bernaudin, M., *et al.* A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **19**, 643-651 (1999).
  19. Bernaudin, M., *et al.* Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **22**, 393-403 (2002).
  20. Bierer, R., Peceny, M.C., Hartenberger, C.H. & Ohls, R.K. Erythropoietin concentrations and neurodevelopmental outcome in preterm infants. *Pediatrics* **118**, e635-640 (2006).
  21. Bredesen, D.E., Rao, R.V. & Mehlen, P. Cell death in the nervous system. *Nature* **443**, 796-802 (2006).
  22. Brines, M. & Cerami, A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* **6**, 484-494 (2005).
  23. Brines, M., *et al.* Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14907-14912 (2004).
  24. Brines, M.L., *et al.* Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10526-10531 (2000).
  25. Brunet, A., Datta, S.R. & Greenberg, M.E. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Current Opinion in Neurobiology* **11**, 297-305 (2001).
  26. Byts, N., *et al.* Essential role for Stat5 in the neurotrophic but not in the neuroprotective effect of erythropoietin. *Cell Death and Differentiation* (2008).
- C**
27. Calapai, G., *et al.* Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *European Journal of Pharmacology* **401**, 349-356 (2000).
  28. Carbonell-Estrany, X., Figueras-Aloy, J. & Alvarez, E. Erythropoietin and prematurity--where do we stand? *Journal of Perinatal Medicine* **33**, 277-286 (2005).
  29. Chavez, J.C., Baranova, O., Lin, J. & Pichiule, P. The transcriptional activator hypoxia inducible factor 2 (HIF-2/EPAS-1) regulates the oxygen-dependent expression of erythropoietin in cortical astrocytes. *J Neurosci* **26**, 9471-9481 (2006).
  30. Chen, C., Edelstein, L.C. & Gelinas, C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Molecular and Cellular Biology* **20**, 2687-2695 (2000).
  31. Chen, G., *et al.* Inhibitory effect on cerebral inflammatory agents that accompany traumatic brain injury in a rat model: a potential neuroprotective mechanism of recombinant human erythropoietin (rhEPO). *Neurosci Lett* **425**, 177-182 (2007).
  32. Chen, Z.Y., Asavaritikrai, P., Prchal, J.T. & Noguchi, C.T. Endogenous erythropoietin signaling is required for normal neural progenitor cell proliferation. *J Biol Chem* **282**, 25875-25883 (2007).
  33. Chen, Z.Y., Warin, R. & Noguchi, C.T. Erythropoietin and normal brain development: receptor expression determines multi-tissue response. *Neurodegenerative Diseases* **3**, 68-75 (2006).
  34. Cherian, L., Goodman, J.C. & Robertson, C. Neuroprotection with erythropoietin administration following controlled cortical impact injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **322**, 789-794 (2007).
  35. Cheung, E.C., *et al.* Apoptosis-inducing factor is a key factor in neuronal cell death propagated by BAX-dependent and BAX-independent mechanisms. *J Neurosci* **25**, 1324-1334 (2005).

36. Chin, K., Oda, N., Shen, K. & Noguchi, C.T. Regulation of transcription of the human erythropoietin receptor gene by proteins binding to GATA-1 and Sp1 motifs. *Nucleic Acids Research* **23**, 3041-3049 (1995).
37. Chin, K., *et al.* Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Molecular Brain Research* **81**, 29-42 (2000).
38. Chong, Z.Z., Kang, J.Q. & Maiese, K. Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. *British Journal of Pharmacology* **138**, 1107-1118 (2003).
39. Chong, Z.Z., Li, F. & Maiese, K. Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity. *Current Neurovascular Research* **2**, 387-399 (2005).
40. Chu, K., *et al.* Erythropoietin reduces epileptogenic processes following status epilepticus. *Epilepsia* (2008).
41. Chung, Y.H., *et al.* Age-related changes in erythropoietin immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus of rats. *Brain Research* **1018**, 141-146 (2004).
42. Coleman, T.R., *et al.* Cytoprotective doses of erythropoietin or carbamylated erythropoietin have markedly different procoagulant and vasoactive activities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 5965-5970 (2006).
43. Conrad, K.P., Benyo, D.F., Westerhausen-Larsen, A. & Miles, T.M. Expression of erythropoietin by the human placenta. *Faseb J* **10**, 760-768 (1996).
44. Constantinescu, S.N., Ghaffari, S. & Lodish, H.F. The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **10**, 18-23 (1999).
45. Cory, S. & Adams, J.M. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-656 (2002).
46. Covolán, L. & Mello, L.E. Temporal profile of neuronal injury following pilocarpine or kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Research* **39**, 133-152 (2000).
47. Culmsee, C. & Mattson, M.P. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 761-777 (2005).

## D

48. D'Andrea, R.J. & Gonda, T.J. A model for assembly and activation of the GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors: insights from activated mutants of the common beta subunit. *Exp Hematol* **28**, 231-243 (2000).
49. De Simoni, M.G., *et al.* Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *European Journal of Neuroscience* **12**, 2623-2633 (2000).
50. DeGiorgio, C.M., *et al.* Neuron-specific enolase, a marker of acute neuronal injury, is increased in complex partial status epilepticus. *Epilepsia* **37**, 606-609 (1996).
51. DeGiorgio, C.M., Tomiyasu, U., Gott, P.S. & Treiman, D.M. Hippocampal pyramidal cell loss in human status epilepticus. *Epilepsia* **33**, 23-27 (1992).
52. DeLorenzo, R.J., *et al.* A prospective, population-based epidemiologic study of status epilepticus in Richmond, Virginia. *Neurology* **46**, 1029-1035 (1996).
53. Demers, E.J., McPherson, R.J. & Juul, S.E. Erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcomes in juvenile rats after neonatal hypoxia-ischemia. *Pediatric Research* **58**, 297-301 (2005).
54. Digicaylioglu, M., *et al.* Localization of specific erythropoietin binding sites in defined areas of the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 3717-3720 (1995).
55. Digicaylioglu, M., Garden, G., Timberlake, S., Fletcher, L. & Lipton, S.A. Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 9855-9860 (2004).

56. Digicaylioglu, M. & Lipton, S.A. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* **412**, 641-647 (2001).
57. Dzierko, M., *et al.* Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. *Neurobiology of Disease* **15**, 177-187 (2004).

**E**

58. Ehrenreich, H., *et al.* Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Molecular Psychiatry* **9**, 42-54 (2004).
59. Ehrenreich, H., *et al.* Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis. *Brain* **130**, 2577-2588 (2007).
60. Ehrenreich, H., *et al.* Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Molecular Medicine* **8**, 495-505 (2002).
61. Ehrenreich, H., *et al.* A hematopoietic growth factor, thrombopoietin, has a proapoptotic role in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 862-867 (2005).
62. Ehrenreich, H., *et al.* Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Molecular Psychiatry* **12**, 206-220 (2007).
63. Eid, T., *et al.* Increased expression of erythropoietin receptor on blood vessels in the human epileptogenic hippocampus with sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **63**, 73-83 (2004).
64. Elliott, S. Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. *British Journal of Pharmacology* **154**, 529-541 (2008).
65. Elliott, S., *et al.* Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression. *Blood* **107**, 1892-1895 (2006).
66. Erbayraktar, S., *et al.* Carbamylated erythropoietin reduces radiosurgically-induced brain injury. *Molecular Medicine* **12**, 74-80 (2006).
67. Erbayraktar, S., *et al.* Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6741-6746 (2003).
68. Eriksson, C., Zou, L.P., Ahlenius, S., Winblad, B. & Schultzberg, M. Inhibition of kainic acid induced expression of interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist mRNA in the rat brain by NMDA receptor antagonists. *Molecular Brain Research* **85**, 103-113 (2000).

**F**

69. Faden, A.I. & Stoica, B. Neuroprotection: challenges and opportunities. *Arch Neurol* **64**, 794-800 (2007).
70. Farber, E. Programmed cell death: necrosis versus apoptosis. *Mod Pathol* **7**, 605-609 (1994).
71. Farina, C., Aloisi, F. & Meinl, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* **28**, 138-145 (2007).
72. Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M. & Tsai, L.H. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature* **447**, 178-182 (2007).
73. Fountain, N.B. Status epilepticus: risk factors and complications. *Epilepsia* **41 Suppl 2**, S23-30 (2000).
74. Fu, Q.L., *et al.* Up-regulated endogenous erythropoietin/erythropoietin receptor system and exogenous erythropoietin rescue retinal ganglion cells after chronic ocular hypertension. *Cellular and Molecular Neurobiology* **28**, 317-329 (2008).
75. Fujikawa, D.G. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Research* **725**, 11-22 (1996).
76. Fujikawa, D.G. Confusion between neuronal apoptosis and activation of programmed cell death mechanisms in acute necrotic insults. *Trends Neurosci* **23**, 410-411 (2000).

77. Fujikawa, D.G., Shinmei, S.S. & Cai, B. Lithium-pilocarpine-induced status epilepticus produces necrotic neurons with internucleosomal DNA fragmentation in adult rats. *Eur J Neurosci* **11**, 1605-1614 (1999).

**G**

78. Galea, I., Bechmann, I. & Perry, V.H. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol* **28**, 12-18 (2007).
79. Gidday, J.M. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nature Reviews Neuroscience* **7**, 437-448 (2006).
80. Gil, J.M., Leist, M., Popovic, N., Brundin, P. & Petersen, A. Asialoerythropoietin is not effective in the R6/2 line of Huntington's disease mice. *BMC Neurosci* **5**, 17 (2004).
81. Gonzalez, F.F., *et al.* Erythropoietin enhances long-term neuroprotection and neurogenesis in neonatal stroke. *Dev Neurosci* **29**, 321-330 (2007).
82. Gosselin, D. & Rivest, S. Role of IL-1 and TNF in the brain: twenty years of progress on a Dr. Jekyll/Mr. Hyde duality of the innate immune system. *Brain Behav Immun* **21**, 281-289 (2007).
83. Grasso, G., *et al.* Beneficial effects of systemic administration of recombinant human erythropoietin in rabbits subjected to subarachnoid hemorrhage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 5627-5631 (2002).
84. Grasso, G., *et al.* Neuroprotection by erythropoietin administration after experimental traumatic brain injury. *Brain Res* **1182**, 99-105 (2007).
85. Grasso, G., *et al.* Erythropoietin and erythropoietin receptor expression after experimental spinal cord injury encourages therapy by exogenous erythropoietin. *Neurosurgery* **56**, 821-827; discussion 821-827 (2005).
86. Greene, E. & Naranjo, J.N. Degeneration of hippocampal fibers and spatial memory deficit in the aged rat. *Neurobiol Aging* **8**, 35-43 (1987).
87. Grimm, C., *et al.* Neuroprotection by hypoxic preconditioning: HIF-1 and erythropoietin protect from retinal degeneration. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **16**, 531-538 (2005).
88. Grimm, C., *et al.* HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nature Medicine* **8**, 718-724 (2002).
89. Guillemin, G.J. & Brew, B.J. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *Journal of Leukocyte Biology* **75**, 388-397 (2004).

**H**

90. Hanazono, Y., Sasaki, K., Nitta, H., Yazaki, Y. & Hirai, H. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of the beta chain of the GM-CSF receptor. *Biochem Biophys Res Commun* **208**, 1060-1066 (1995).
91. Hanisch, U.K. & Kettenmann, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* **10**, 1387-1394 (2007).
92. Hasselblatt, M., Ehrenreich, H. & Siren, A.L. The brain erythropoietin system and its potential for therapeutic exploitation in brain disease. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* **18**, 132-138 (2006).
93. Hattiangady, B., Rao, M.S., Shetty, G.A. & Shetty, A.K. Brain-derived neurotrophic factor, phosphorylated cyclic AMP response element binding protein and neuropeptide Y decline as early as middle age in the dentate gyrus and CA1 and CA3 subfields of the hippocampus. *Exp Neurol* **195**, 353-371 (2005).
94. Henke, M., Verma, A. & Acs, G. Erythropoietin receptors on cancer cells: exciting perspectives, difficult to appreciate. *Blood* **108**, 1107-1108; author reply 1108-1109 (2006).

95. Henshall, D.C., *et al.* Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death. *J Neurosci* **22**, 8458-8465 (2002).
96. Henshall, D.C., *et al.* Formation of the Apaf-1/cytochrome c complex precedes activation of caspase-9 during seizure-induced neuronal death. *Cell Death Differ* **8**, 1169-1181 (2001).
97. Henshall, D.C., *et al.* Cleavage of bid may amplify caspase-8-induced neuronal death following focally evoked limbic seizures. *Neurobiol Dis* **8**, 568-580 (2001).
98. Henshall, D.C. & Murphy, B.M. Modulators of neuronal cell death in epilepsy. *Curr Opin Pharmacol* **8**, 75-81 (2008).
99. Henshall, D.C. & Simon, R.P. Epilepsy and apoptosis pathways. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **25**, 1557-1572 (2005).
100. Henshall, D.C., Skradski, S.L., Bonislowski, D.P., Lan, J.Q. & Simon, R.P. Caspase-2 activation is redundant during seizure-induced neuronal death. *J Neurochem* **77**, 886-895 (2001).
101. Henshall, D.C., *et al.* Expression and differential processing of caspases 6 and 7 in relation to specific epileptiform EEG patterns following limbic seizures. *Neurobiol Dis* **10**, 71-87 (2002).
102. Hesdorffer, D.C., Logroscino, G., Cascino, G., Annegers, J.F. & Hauser, W.A. Incidence of status epilepticus in Rochester, Minnesota, 1965-1984. *Neurology* **50**, 735-741 (1998).
103. Higuchi, M., Honda, T., Proske, R.J. & Yeh, E.T. Regulation of reactive oxygen species-induced apoptosis and necrosis by caspase 3-like proteases. *Oncogene* **17**, 2753-2760 (1998).
104. Hilton, D.J., Watowich, S.S., Katz, L. & Lodish, H.F. Saturation mutagenesis of the WSXWS motif of the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* **271**, 4699-4708 (1996).
105. Hilton, D.J., Watowich, S.S., Murray, P.J. & Lodish, H.F. Increased cell surface expression and enhanced folding in the endoplasmic reticulum of a mutant erythropoietin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 190-194 (1995).
106. Huang, L.J., Constantinescu, S.N. & Lodish, H.F. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* **8**, 1327-1338 (2001).

**I**

107. Inoue, K., Morimoto, K., Sato, K., Yamada, N. & Otsuki, S. Mechanisms in the development of limbic status epilepticus and hippocampal neuron loss: an experimental study in a model of status epilepticus induced by kindling-like electrical stimulation of the deep prepyriform cortex in rats. *Acta Med Okayama* **46**, 129-139 (1992).
108. Ishimaru, M.J., *et al.* Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol* **408**, 461-476 (1999).
109. Iwai, M., *et al.* Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. *Stroke* **38**, 2795-2803 (2007).

**J**

110. Jelkmann, W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiological Reviews* **72**, 449-489 (1992).
111. Jelkmann, W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP. *European Journal of Haematology* **69**, 265-274 (2002).
112. Jelkmann, W. Molecular biology of erythropoietin. *Internal Medicine* **43**, 649-659 (2004).
113. Jelkmann, W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *European Journal of Haematology* **78**, 183-205 (2007).

114. Jiang, M., Oliva, A.A., Jr., Lam, T. & Swann, J.W. GABAergic neurons that pioneer hippocampal area CA1 of the mouse: morphologic features and multiple fates. *J Comp Neurol* **439**, 176-192 (2001).
115. Jubinsky, P.T., Krijanovski, O.I., Nathan, D.G., Tavernier, J. & Sieff, C.A. The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood* **90**, 1867-1873 (1997).
116. Juul, S.E., *et al.* A phase I/II trial of high-dose erythropoietin in extremely low birth weight infants: pharmacokinetics and safety. *Pediatrics* **122**, 383-391 (2008).
117. Juul, S.E., *et al.* Erythropoietin concentrations in cerebrospinal fluid of nonhuman primates and fetal sheep following high-dose recombinant erythropoietin. *Biol Neonate* **85**, 138-144 (2004).
118. Juul, S.E., Yachnis, A.T. & Christensen, R.D. Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus. *Early Human Development* **52**, 235-249 (1998).
119. Juul, S.E., Yachnis, A.T., Rojiani, A.M. & Christensen, R.D. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatric and Developmental Pathology* **2**, 148-158 (1999).

## K

120. Kadar, T., Silbermann, M., Brandeis, R. & Levy, A. Age-related structural changes in the rat hippocampus: correlation with working memory deficiency. *Brain Res* **512**, 113-120 (1990).
121. Kawakami, M., Sekiguchi, M., Sato, K., Kozaki, S. & Takahashi, M. Erythropoietin receptor-mediated inhibition of exocytotic glutamate release confers neuroprotection during chemical ischemia. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 39469-39475 (2001).
122. Kempermann, G. & Neumann, H. Neuroscience. Microglia: the enemy within? *Science* **302**, 1689-1690 (2003).
123. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* **26**, 239-257 (1972).
124. Kilic, E., *et al.* Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *FASEB Journal* **19**, 2026-2028 (2005).
125. Kirkeby, A., van Beek, J., Nielsen, J., Leist, M. & Helboe, L. Functional and immunochemical characterisation of different antibodies against the erythropoietin receptor. *Journal of Neuroscience Methods* **164**, 50-58 (2007).
126. Knabe, W., *et al.* Expression patterns of erythropoietin and its receptor in the developing midbrain. *Anatomy and Embryology* **207**, 503-512 (2004).
127. Korhonen, L., Belluardo, N. & Lindholm, D. Regulation of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in kainic acid-induced neuronal death in the rat hippocampus. *Mol Cell Neurosci* **17**, 364-372 (2001).
128. Korhonen, L., Belluardo, N., Mudo, G. & Lindholm, D. Increase in Bcl-2 phosphorylation and reduced levels of BH3-only Bcl-2 family proteins in kainic acid-mediated neuronal death in the rat brain. *Eur J Neurosci* **18**, 1121-1134 (2003).
129. Koshimura, K., Murakami, Y., Sohmiya, M., Tanaka, J. & Kato, Y. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *Journal of Neurochemistry* **72**, 2565-2572 (1999).
130. Krantic, S., Mechawar, N., Reix, S. & Quirion, R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends in Neurosciences* **28**, 670-676 (2005).
131. Kretz, A., Happold, C.J., Marticke, J.K. & Isenmann, S. Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation. *Molecular and Cellular Neurosciences* **29**, 569-579 (2005).

132. Kubatzky, K.F., *et al.* Structural requirements of the extracellular to transmembrane domain junction for erythropoietin receptor function. *J Biol Chem* **280**, 14844-14854 (2005).
133. Kumral, A., *et al.* Erythropoietin improves long-term spatial memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Behavioural Brain Research* **153**, 77-86 (2004).
- L**
134. Lalancette-Hebert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y.C. & Kriz, J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* **27**, 2596-2605 (2007).
135. Lasne, F. & de Ceaurriz, J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature* **405**, 635 (2000).
136. LeDouarin, N. Les cellules souches, porteuses d'immortalité (ed. Jacob, O.) 410 (Paris, 2007).
137. Leist, M., *et al.* Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* **305**, 239-242 (2004).
138. Leite, J.P., Garcia-Cairasco, N. & Cavalheiro, E.A. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Research* **50**, 93-103 (2002).
139. Li, T., Fan, Y., Luo, Y., Xiao, B. & Lu, C. In vivo delivery of a XIAP (BIR3-RING) fusion protein containing the protein transduction domain protects against neuronal death induced by seizures. *Exp Neurol* **197**, 301-308 (2006).
140. Li, T., Lu, C., Xia, Z., Xiao, B. & Luo, Y. Inhibition of caspase-8 attenuates neuronal death induced by limbic seizures in a cytochrome c-dependent and Smac/DIABLO-independent way. *Brain Res* **1098**, 204-211 (2006).
141. Li, W., *et al.* Beneficial effect of erythropoietin on experimental allergic encephalomyelitis. *Ann Neurol* **56**, 767-777 (2004).
142. Li, X., Gonias, S.L. & Campana, W.M. Schwann cells express erythropoietin receptor and represent a major target for Epo in peripheral nerve injury. *Glia* **51**, 254-265 (2005).
143. Li, Y., Lu, Z., Keogh, C.L., Yu, S.P. & Wei, L. Erythropoietin-induced neurovascular protection, angiogenesis, and cerebral blood flow restoration after focal ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 1043-1054 (2007).
144. Liao, Z.B., Zhi, X.G., Shi, Q.H. & He, Z.H. Recombinant human erythropoietin administration protects cortical neurons from traumatic brain injury in rats. *European Journal of Neurology* **15**, 140-149 (2008).
145. Lipton, S.A. Pathologically activated therapeutics for neuroprotection. *Nature Reviews. Neuroscience* **8**, 803-808 (2007).
146. Liu, C., Shen, K., Liu, Z. & Noguchi, C.T. Regulated human erythropoietin receptor expression in mouse brain. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 32395-32400 (1997).
147. Liu, R., Suzuki, A., Guo, Z., Mizuno, Y. & Urabe, T. Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion injury in vitro. *Journal of Neurochemistry* **96**, 1101-1110 (2006).
148. Liu, W., Rong, Y., Baudry, M. & Schreiber, S.S. Status epilepticus induces p53 sequence-specific DNA binding in mature rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* **63**, 248-253 (1999).
149. Logroscino, G., *et al.* Long-term mortality after a first episode of status epilepticus. *Neurology* **58**, 537-541 (2002).
150. Lothman, E.W., Bertram, E.H., Kapur, J. & Stringer, J.L. Recurrent spontaneous hippocampal seizures in the rat as a chronic sequela to limbic status epilepticus. *Epilepsy Research* **6**, 110-118 (1990).
151. Lowenstein, D.H. Treatment options for status epilepticus. *Current Opinion in Pharmacology* **5**, 334-339 (2005).
152. Lu, D., *et al.* Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma* **22**, 1011-1017 (2005).

**M**

153. Mahmood, A., *et al.* Treatment of traumatic brain injury in rats with erythropoietin and carbamylated erythropoietin. *J Neurosurg* **107**, 392-397 (2007).
154. Maiese, K., Chong, Z.Z., Li, F. & Shang, Y.C. Erythropoietin: elucidating new cellular targets that broaden therapeutic strategies. *Progress in Neurobiology* **85**, 194-213 (2008).
155. Maiese, K., Chong, Z.Z. & Shang, Y.C. Raves and risks for erythropoietin. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 145-155 (2008).
156. Maiese, K., Li, F. & Chong, Z.Z. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends in Pharmacological Sciences* **25**, 577-583 (2004).
157. Malhotra, S., Savitz, S.I., Ocava, L. & Rosenbaum, D.M. Ischemic preconditioning is mediated by erythropoietin through PI-3 kinase signaling in an animal model of transient ischemic attack. *Journal of Neuroscience Research* **83**, 19-27 (2006).
158. Marti, H.H. Erythropoietin and the hypoxic brain. *Journal of Experimental Biology* **207**, 3233-3242 (2004).
159. Marti, H.H., *et al.* Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *European Journal of Neuroscience* **8**, 666-676 (1996).
160. Martinez-Estrada, O.M., *et al.* Erythropoietin protects the in vitro blood-brain barrier against VEGF-induced permeability. *Eur J Neurosci* **18**, 2538-2544 (2003).
161. McColl, B.W., Allan, S.M. & Rothwell, N.J. Systemic inflammation and stroke: aetiology, pathology and targets for therapy. *Biochem Soc Trans* **35**, 1163-1165 (2007).
162. McPherson, R.J., Demers, E.J. & Juul, S.E. Safety of high-dose recombinant erythropoietin in a neonatal rat model. *Neonatology* **91**, 36-43 (2007).
163. Mennini, T., *et al.* Nonhematopoietic erythropoietin derivatives prevent motoneuron degeneration in vitro and in vivo. *Mol Med* **12**, 153-160 (2006).
164. Miskowiak, K., *et al.* Differential effects of erythropoietin on neural and cognitive measures of executive function 3 and 7 days post-administration. *Exp Brain Res* **184**, 313-321 (2008).
165. Miskowiak, K., O'Sullivan, U. & Harmer, C.J. Erythropoietin enhances hippocampal response during memory retrieval in humans. *J Neurosci* **27**, 2788-2792 (2007).
166. Mohapatra, S., *et al.* Roscovitine inhibits STAT5 activity and induces apoptosis in the human leukemia virus type 1-transformed cell line MT-2. *Cancer Research* **63**, 8523-8530 (2003).
167. Mohapel, P., Dufresne, C., Kelly, M.E. & McIntyre, D.C. Differential sensitivity of various temporal lobe structures in the rat to kindling and status epilepticus induction. *Epilepsy Res* **23**, 179-187 (1996).
168. Morakkabati, N., Gollnick, F., Meyer, R., Fandrey, J. & Jelkmann, W. Erythropoietin induces Ca<sup>2+</sup> mobilization and contraction in rat mesangial and aortic smooth muscle cultures. *Exp Hematol* **24**, 392-397 (1996).
169. Morales, A., *et al.* Unexpected expression of orexin-B in basal conditions and increased levels in the adult rat hippocampus during pilocarpine-induced epileptogenesis. *Brain Research* **1109**, 164-175 (2006).
170. Morimoto, K., Fahnstock, M. & Racine, R.J. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Prog Neurobiol* **73**, 1-60 (2004).
171. Morishita, E., Masuda, S., Nagao, M., Yasuda, Y. & Sasaki, R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* **76**, 105-116 (1997).
172. Morrison, J.H. & Hof, P.R. Life and death of neurons in the aging brain. *Science* **278**, 412-419 (1997).
173. Morrison, J.H. & Hof, P.R. Life and death of neurons in the aging cerebral cortex. *Int Rev Neurobiol* **81**, 41-57 (2007).
174. Mullen, R.J., Buck, C.R. & Smith, A.M. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* **116**, 201-211 (1992).

175. Mun, K.C. & Golper, T.A. Impaired biological activity of erythropoietin by cyanate carbamylation. *Blood Purif* **18**, 13-17 (2000).

## N

176. Nadam, J., *et al.* Neuroprotective effects of erythropoietin in the rat hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis* **25**, 412-426 (2007).
177. Nagai, A., *et al.* Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **60**, 386-392 (2001).
178. Nagao, M., Masuda, S., Abe, S., Ueda, M. & Sasaki, R. Production and ligand-binding characteristics of the soluble form of murine erythropoietin receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **188**, 888-897 (1992).
179. Narkilahti, S. & Pitkanen, A. Caspase 6 expression in the rat hippocampus during epileptogenesis and epilepsy. *Neuroscience* **131**, 887-897 (2005).
180. Navarro y Garcia, F. University of Claude Bernard Lyon 1 (2007).
181. Nehlig, A. What is animal experimentation telling us about new drug treatments of status epilepticus? *Epilepsia* **48 Suppl 8**, 78-81 (2007).
182. Neumann, J., *et al.* Microglia provide neuroprotection after ischemia. *Faseb J* **20**, 714-716 (2006).
183. Neuwelt, E., *et al.* Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol* **7**, 84-96 (2008).
184. NIH, U.S.N.I.f.H. *Clinical trials* [en ligne]. Disponible sur: <<http://clinicaltrials.gov/>> (consulté le 30.09.2008)
185. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* **308**, 1314-1318 (2005).
186. Nithianantharajah, J. & Hannan, A.J. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews. Neuroscience* **7**, 697-709 (2006).
187. Noguchi, C.T., Asavaritikrai, P., Teng, R. & Jia, Y. Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol Hematol* (2007).

## O-P

188. Ohls, R.K., *et al.* Neurodevelopmental outcome and growth at 18 to 22 months' corrected age in extremely low birth weight infants treated with early erythropoietin and iron. *Pediatrics* **114**, 1287-1291 (2004).
189. Ohneda, O., Yanai, N. & Obinata, M. Erythropoietin as a mitogen for fetal liver stromal cells which support erythropoiesis. *Exp Cell Res* **208**, 327-331 (1993).
190. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, (Academic Press, 1998).
191. Pillai, A. & Mahadik, S.P. Differential effects of haloperidol and olanzapine on the expression of erythropoietin and its receptor in rat hippocampus and striatum. *Journal of Neurochemistry* **98**, 1411-1422 (2006).
192. Prass, K., *et al.* Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke* **34**, 1981-1986 (2003).
193. Prunell, G.F. & Troy, C.M. Balancing neuronal death. *Journal of Neuroscience Research* **78**, 1-6 (2004).

## R

194. Rampon, C., *et al.* Effects of environmental enrichment on gene expression in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 12880-12884 (2000).
195. Ransohoff, R.M. Microgliosis: the questions shape the answers. *Nat Neurosci* **10**, 1507-1509 (2007).
196. Ransome, M.I. & Turnley, A.M. Erythropoietin promotes axonal growth in a model of neuronal polarization. *Mol Cell Neurosci* **38**, 537-547 (2008).

197. Ravid, O., *et al.* An extracellular region of the erythropoietin receptor of the subterranean blind mole rat *Spalax* enhances receptor maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14360-14365 (2007).
198. Ravizza, T., *et al.* Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* **29**, 142-160 (2008).
199. Raza, M., *et al.* Evidence that injury-induced changes in hippocampal neuronal calcium dynamics during epileptogenesis cause acquired epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 17522-17527 (2004).
200. Repici, M., Mariani, J. & Borsello, T. Neuronal death and neuroprotection: a review. *Methods in Molecular Biology* **399**, 1-14 (2007).
201. Ribatti, D., Vacca, A., Roccaro, A.M., Crivellato, E. & Presta, M. Erythropoietin as an angiogenic factor. *Eur J Clin Invest* **33**, 891-896 (2003).
202. Romijn, H.J., Hofman, M.A. & Gramsbergen, A. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term newborn human baby? *Early Hum Dev* **26**, 61-67 (1991).
203. Rosell, D.R., Nacher, J., Akama, K.T. & McEwen, B.S. Spatiotemporal distribution of gp130 cytokines and their receptors after status epilepticus: comparison with neuronal degeneration and microglial activation. *Neuroscience* **122**, 329-348 (2003).
204. Rothwell, N.J. Annual review prize lecture cytokines - killers in the brain? *J Physiol* **514 ( Pt 1)**, 3-17 (1999).
205. Roy, M. & Sapolsky, R. Neuronal apoptosis in acute necrotic insults: why is this subject such a mess? *Trends Neurosci* **22**, 419-422 (1999).
206. Ruscher, K., *et al.* Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *Journal of Neuroscience* **22**, 10291-10301 (2002).

## S

207. Sakanaka, M., *et al.* In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 4635-4640 (1998).
208. Sasaki, R., Masuda, S. & Nagao, M. Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**, 1775-1793 (2000).
209. Sattler, M.B., *et al.* Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin in a rat model of multiple sclerosis. *Cell Death and Differentiation* **11 Suppl 2**, S181-192 (2004).
210. Savino, C., *et al.* Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* **172**, 27-37 (2006).
211. Schmidt, R.E., *et al.* Erythropoietin and its carbamylated derivative prevent the development of experimental diabetic autonomic neuropathy in STZ-induced diabetic NOD-SCID mice. *Experimental Neurology* **209**, 161-170 (2008).
212. Schmued, L.C. & Hopkins, K.J. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Research* **874**, 123-130 (2000).
213. Schwartz, M., Butovsky, O., Bruck, W. & Hanisch, U.K. Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends in Neurosciences* **29**, 68-74 (2006).
214. Scott, R.C., King, M.D., Gadian, D.G., Neville, B.G. & Connelly, A. Hippocampal abnormalities after prolonged febrile convulsion: a longitudinal MRI study. *Brain* **126**, 2551-2557 (2003).
215. Semenza, G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical Pharmacology* **64**, 993-998 (2002).
216. Shams, I., Nevo, E. & Avivi, A. Erythropoietin receptor spliced forms differentially expressed in blind subterranean mole rats. *Faseb J* **19**, 1749-1751 (2005).

217. Shang, Y., *et al.* Protective effect of erythropoietin against ketamine-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons: involvement of PI3K/Akt and GSK-3 beta pathway. *Apoptosis* **12**, 2187-2195 (2007).
218. Shapiro, L.A., Wang, L. & Ribak, C.E. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsia* **49 Suppl 2**, 33-41 (2008).
219. Sharp, F.R. & Bernaudin, M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nature Reviews Neuroscience* **5**, 437-448 (2004).
220. Shein, N.A., Horowitz, M., Alexandrovich, A.G., Tsenter, J. & Shohami, E. Heat acclimation increases hypoxia-inducible factor 1alpha and erythropoietin receptor expression: implication for neuroprotection after closed head injury in mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **25**, 1456-1465 (2005).
221. Shingo, T., Sorokan, S.T., Shimazaki, T. & Weiss, S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *Journal of Neuroscience* **21**, 9733-9743 (2001).
222. Simard, A.R. & Rivest, S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J* **18**, 998-1000 (2004).
223. Simi, A., Tsakiri, N., Wang, P. & Rothwell, N.J. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochemical Society Transactions* **35**, 1122-1126 (2007).
224. Sinclair, A.M., *et al.* Erythropoietin receptor transcription is neither elevated nor predictive of surface expression in human tumour cells. *Br J Cancer* **98**, 1059-1067 (2008).
225. Siren, A.L. & Ehrenreich, H. Erythropoietin--a novel concept for neuroprotection. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* **251**, 179-184 (2001).
226. Siren, A.L., *et al.* Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4044-4049 (2001).
227. Siren, A.L., *et al.* Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathologica* **101**, 271-276 (2001).
228. Siren, A.L., *et al.* Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain* **129**, 480-489 (2006).
229. Sloviter, R.S. Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. *Science* **235**, 73-76 (1987).
230. Sloviter, R.S. Apoptosis: a guide for the perplexed. *Trends in Pharmacological Sciences* **23**, 19-24 (2002).
231. Sloviter, R.S. The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge. *Comptes Rendus Biologies* **328**, 143-153 (2005).
232. Smith, T.D., Adams, M.M., Gallagher, M., Morrison, J.H. & Rapp, P.R. Circuit-specific alterations in hippocampal synaptophysin immunoreactivity predict spatial learning impairment in aged rats. *J Neurosci* **20**, 6587-6593 (2000).
233. Sola, A., Rogido, M., Lee, B.H., Genetta, T. & Wen, T.C. Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatric Research* **57**, 481-487 (2005).
234. Soliz, J., Gassmann, M. & Joseph, V. Soluble erythropoietin receptor is present in the mouse brain and is required for the ventilatory acclimatization to hypoxia. *Journal of Physiology* **583**, 329-336 (2007).
235. Soliz, J., *et al.* Erythropoietin regulates hypoxic ventilation in mice by interacting with brainstem and carotid bodies. *Journal of Physiology* **568**, 559-571 (2005).
236. Soulet, D. & Rivest, S. Bone-marrow-derived microglia: myth or reality? *Curr Opin Pharmacol* (2008).
237. Spandou, E., *et al.* Erythropoietin prevents long-term sensorimotor deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Brain Research* **1045**, 22-30 (2005).

238. Spandou, E., *et al.* Hypoxia-ischemia affects erythropoietin and erythropoietin receptor expression pattern in the neonatal rat brain. *Brain Research* **1021**, 167-172 (2004).
239. Statler, P.A., McPherson, R.J., Bauer, L.A., Kellert, B.A. & Juul, S.E. Pharmacokinetics of high-dose recombinant erythropoietin in plasma and brain of neonatal rats. *Pediatr Res* **61**, 671-675 (2007).
240. Stefanis, L. Caspase-dependent and -independent neuronal death: two distinct pathways to neuronal injury. *Neuroscientist* **11**, 50-62 (2005).
241. Streit, W.J., Walter, S.A. & Pennell, N.A. Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* **57**, 563-581 (1999).
242. Sugawa, M., Sakurai, Y., Ishikawa-Ieda, Y., Suzuki, H. & Asou, H. Effects of erythropoietin on glial cell development; oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci Res* **44**, 391-403 (2002).
243. Sun, Y., Calvert, J.W. & Zhang, J.H. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* **36**, 1672-1678 (2005).
244. Sun, Y., Zhou, C., Polk, P., Nanda, A. & Zhang, J.H. Mechanisms of erythropoietin-induced brain protection in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **24**, 259-270 (2004).

## T

245. Tan, Z., *et al.* Differential induction of p53 in immature and adult rat brain following lithium-pilocarpine status epilepticus. *Brain Res* **928**, 187-193 (2002).
246. Tan, Z., *et al.* Immunohistochemical study of p53-associated proteins in rat brain following lithium-pilocarpine status epilepticus. *Brain Res* **929**, 129-138 (2002).
247. Thomas, W.E. Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells. *Brain Res Brain Res Rev* **31**, 42-57 (1999).
248. Towne, A.R. Epidemiology and outcomes of status epilepticus in the elderly. *Int Rev Neurobiol* **81**, 111-127 (2007).
249. Towne, A.R., Pellock, J.M., Ko, D. & DeLorenzo, R.J. Determinants of mortality in status epilepticus. *Epilepsia* **35**, 27-34 (1994).
250. Tsai, P.T., *et al.* A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *Journal of Neuroscience* **26**, 1269-1274 (2006).
251. Turrin, N.P. & Rivest, S. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol Dis* **16**, 321-334 (2004).
252. Turrin, N.P. & Rivest, S. Molecular and cellular immune mediators of neuroprotection. *Molecular Neurobiology* **34**, 221-242 (2006).
253. Turski, W.A., *et al.* Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural Brain Research* **9**, 315-335 (1983).
254. Tuunanen, J., Lukasiuk, K., Halonen, T. & Pitkanen, A. Status epilepticus-induced neuronal damage in the rat amygdaloid complex: distribution, time-course and mechanisms. *Neuroscience* **94**, 473-495 (1999).

## U-V

255. Um, M., Gross, A.W. & Lodish, H.F. A "classical" homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cellular signalling* **19**, 634-645 (2007).
256. Um, M. & Lodish, H.F. Antiapoptotic effects of erythropoietin in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells require activation of both the STAT5 and AKT signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* [Epub ahead of print](2006).

257. Uzum, G., Sarper Diler, A., Bahcekapili, N. & Ziya Ziylan, Y. Erythropoietin prevents the increase in blood-brain barrier permeability during pentylentetrazol induced seizures. *Life Sciences* **78**, 2571-2576 (2006).
258. van Praag, H., Kempermann, G. & Gage, F.H. Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews. Neuroscience* **1**, 191-198 (2000).
259. Van Wagoner, N.J. & Benveniste, E.N. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol* **100**, 124-139 (1999).
260. Verdier, F., Gomez, S., Lacombe, C. & Mayeux, P. Selected anti-Epo receptor antibodies predict Epo receptor expression. *Blood* **108**, 1106; author reply 1107 (2006).
261. Vezzani, A. & Baram, T.Z. New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy Curr* **7**, 45-50 (2007).
262. Vezzani, A. & Granata, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* **46**, 1724-1743 (2005).
263. Vezzani, A., Ravizza, T., Balosso, S. & Aronica, E. Glia as a source of cytokines: implications for neuronal excitability and survival. *Epilepsia* **49 Suppl 2**, 24-32 (2008).
264. Villa, P., *et al.* Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 971-975 (2003).
265. Villa, P., *et al.* Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* (2006).
266. Vitkovic, L., Maeda, S. & Sternberg, E. Anti-inflammatory cytokines: expression and action in the brain. *Neuroimmunomodulation* **9**, 295-312 (2001).
267. Voutsinos-Porche, B., *et al.* Temporal patterns of the cerebral inflammatory response in the rat lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* **17**, 385-402 (2004).

## W

268. Walrafen, P., *et al.* Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* **105**, 600-608 (2005).
269. Wang, C.X. & Shuaib, A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. *Prog Neurobiol* **67**, 161-172 (2002).
270. Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V. & Baldwin, A.S., Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**, 1680-1683 (1998).
271. Wang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R. & Chopp, M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* **35**, 1732-1737 (2004).
272. Wang, S., *et al.* Mu-calpain mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res Bull* **76**, 90-96 (2008).
273. Wang, X., *et al.* The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *Journal of Neurochemistry* **91**, 900-910 (2004).
274. Wang, Y., *et al.* Post-ischemic treatment with erythropoietin or carbamylated erythropoietin reduces infarction and improves neurological outcome in a rat model of focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol* **151**, 1377-1384 (2007).
275. Weise, J., *et al.* Expression time course and spatial distribution of activated caspase-3 after experimental status epilepticus: contribution of delayed neuronal cell death to seizure-induced neuronal injury. *Neurobiology of Disease* **18**, 582-590 (2005).
276. Wen, T.C., Rogido, M., Genetta, T. & Sola, A. Permanent focal cerebral ischemia activates erythropoietin receptor in the neonatal rat brain. *Neuroscience Letters* **355**, 165-168 (2004).

277. Wen, T.C., *et al.* Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *Journal of Neuroscience Research* **67**, 795-803 (2002).
278. Wen, X., Huang, Y. & Wang, J. Erythropoietin preconditioning on hippocampus neuronal apoptosis following status epilepticus induced by Li-pilocarpine in rats through anti-caspase-3 expression. *Neurology India* **54**, 58-63 (2006).
279. Westenfelder, C. Unexpected renal actions of erythropoietin. *Exp Nephrol* **10**, 294-298 (2002).
280. Wieshmann, U.C., *et al.* Development of hippocampal atrophy: a serial magnetic resonance imaging study in a patient who developed epilepsy after generalized status epilepticus. *Epilepsia* **38**, 1238-1241 (1997).
281. Williams, K., Alvarez, X. & Lackner, A.A. Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia* **36**, 156-164 (2001).
282. Wojchowski, D.M., Gregory, R.C., Miller, C.P., Pandit, A.K. & Pircher, T.J. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Experimental Cell Research* **253**, 143-156 (1999).
283. Wright, G.L., *et al.* Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. *FASEB Journal* **18**, 1031-1033 (2004).
284. Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. & Lodish, H.F. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* **83**, 59-67 (1995).
285. Wu, Y., Shang, Y., Sun, S., Liang, H. & Liu, R. Erythropoietin prevents PC12 cells from 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis via the Akt/GSK-3beta/caspase-3 mediated signaling pathway. *Apoptosis* **12**, 1365-1375 (2007).

## Y

286. Yamaji, R., *et al.* The intron 5-inserted form of rat erythropoietin receptor is expressed as a membrane-bound form. *Biochimica et Biophysica Acta* **1403**, 169-178 (1998).
287. Yamaji, R., *et al.* Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *European Journal of Biochemistry* **239**, 494-500 (1996).
288. Yamanaka, H., Yanagawa, Y. & Obata, K. Development of stellate and basket cells and their apoptosis in mouse cerebellar cortex. *Neurosci Res* **50**, 13-22 (2004).
289. Yatsiv, I., *et al.* Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB Journal* **19**, 1701-1703 (2005).
290. Young, D., Lawlor, P.A., Leone, P., Dragunow, M. & During, M.J. Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature Medicine* **5**, 448-453 (1999).
291. Youssoufian, H., Longmore, G., Neumann, D., Yoshimura, A. & Lodish, H.F. Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* **81**, 2223-2236 (1993).
292. Yu, X., *et al.* Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development. *Development* **129**, 505-516 (2002).
293. Yu, Y.P., *et al.* Intranasal recombinant human erythropoietin protects rats against focal cerebral ischemia. *Neuroscience Letters* **387**, 5-10 (2005).
294. Yuan, J. & Yankner, B.A. Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**, 802-809 (2000).

## Z

295. Zhang, F., *et al.* Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: potential signaling mechanisms. *Journal of Neuroscience Research* **83**, 1241-1251 (2006).

296. Zhang, F., Wang, S., Cao, G., Gao, Y. & Chen, J. Signal transducers and activators of transcription 5 contributes to erythropoietin-mediated neuroprotection against hippocampal neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Neurobiology of Disease* **25**, 45-53 (2007).

La recherche d'agents neuroprotecteurs dans le cadre d'un accident ou d'une maladie neurologique est une priorité des Neurosciences. Dans l'équipe, nous avons choisi d'étudier les effets neurobiologiques de l'érythropoïétine (Epo), « molécule phare » dans le domaine de la neuroprotection depuis une dizaine d'années. En analysant l'expression cérébrale de l'Epo et celle des constituants potentiels de son site de liaison (récepteur EpoR et chaîne  $\beta$  commune «  $\beta c$  ») au cours du développement postnatal et du vieillissement chez le rat, nous avons invalidé l'hypothèse selon laquelle la  $\beta c$  fait partie du récepteur de l'Epo. De plus, nous avons observé que divers stimuli environnementaux, tels que l'exposition hypoxique et l'enrichissement du milieu de vie, augmentent l'expression de l'EpoR dans des régions vulnérables du cerveau. Dans un modèle de status epilepticus chez le rat, cette augmentation est indispensable à l'amélioration des effets neuroprotecteurs de l'Epo, sans que la réponse inflammatoire précoce ne soit altérée.

*Mots-clés : neuroprotection, érythropoïétine, hypoxie, enrichissement du milieu de vie, status epilepticus, pilocarpine, développement, neuroinflammation.*



Research in the field of neuroprotection is a major concern in Neurosciences. Here, we studied the neurobiological effects of erythropoietin (Epo), which has been considered since a decade as one of the most promising neuroprotective ligands. Based on the expression analysis of Epo and its potential binding sites (EpoR receptor and common  $\beta$  chain «  $\beta c$  ») in the rat brain from early postnatal development to elderly, we invalidate the hypothesis that  $\beta c$  can compose such binding sites in brain tissue. Furthermore, we report that environmental stimuli such as hypoxia exposure and enriched housing enhance EpoR expression in vulnerable brain areas. Finally, in a model of *status epilepticus* in rats, we show that the increase in EpoR expression in neurons is a pre-requisite to improve neuroprotective effects of Epo, without interfering with the acute inflammatory response.

*Keywords: neuroprotection, erythropoietin, hypoxia, enriched housing, status epilepticus, pilocarpine, development, neuroinflammation.*

---

Disciplines : **PHYSIOLOGIE & NEUROSCIENCES**

---

Laboratoire de Physiologie Intégrative Cellulaire et Moléculaire  
UMR5123 CNRS et Université de Lyon 1. Directeur : Pr. Bruno Allard  
Campus de la Doua - 43 boulevard du 11 novembre 1918 - 69100 Villeurbanne

---