

Université de Montréal

**Étude du rôle de l'inflammation dans l'insulte cérébrale
précoce associée à l'hémorragie sous-arachnoïdienne**

par Typhaine Gris

Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Sciences Biomédicales
option Médecine expérimentale

Avril 2020

© Gris Typhaine, 2020

Résumé

L'hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) est une pathologie redoutable résultant fréquemment de la rupture d'un anévrisme intracrânien. Elle est associée à une mortalité élevée et d'importants déficits neurologiques. Le saignement entraîne l'augmentation de la pression intracrânienne, la diminution du flux cérébral sanguin, l'apparition de l'inflammation cérébrale et la mort neuronale. Ces événements de la phase d'insulte cérébrale précoce (72 premières heures) conditionnent le devenir du patient. Le vasospasme était initialement considéré comme la cause principale des ischémies cérébrales retardées (DCI), mais sa diminution pharmacologique n'a montré aucun bénéfice pour les patients. Cependant, l'infiltration rapide des leucocytes dans le SNC suivant le saignement semble impliquée dans le développement des DCI.

Notre hypothèse est que l'activation précoce du système immunitaire à la suite de l'HSA est responsable de la mort neuronale retardée et de la survenue des déficits constatés chez les patients souffrant d'HSA. Nos buts étaient de caractériser la contribution des leucocytes dans l'inflammation cérébrale et la mort neuronale dans un modèle murin d'HSA, de moduler cette inflammation par l'utilisation de la protéine MFG-E8, une protéine anti-inflammatoire favorisant la clairance apoptotique, et de confirmer la présence d'une signature immunologique comparable chez les patients HSA.

Notre modèle murin nous a permis d'induire chirurgicalement l'HSA et d'injecter par voie intrapéritonéale la protéine MFG-E8. La composition cellulaire du sang (humain et murin) et du cerveau des souris a été analysée par cytométrie en flux. Le plasma (humain et murin) et le liquide céphalo-rachidien (LCR) des patients ont été analysés par dosage cytokinique. Certains cerveaux de souris étaient inclus en paraffine pour l'imagerie par microscopie confocale. La lignée cellulaire de microglie nous a permis d'étudier la modulation de la capacité de phagocytose et de production de ROS par l'exposition au sérum ou au LCR de patients HSA.

Dans une première étude, nous avons démontré le rôle de l'inflammation cérébrale précoce dans le développement de la mort neuronale et des symptômes chez les souris HSA. Nous avons également caractérisé la présence de marqueurs inflammatoires systémiques chez les patients HSA.

Dans une deuxième étude, nous avons montré que le traitement par la protéine MFG-E8 chez les souris HSA entraînait la diminution de l'inflammation périphérique ainsi que de la présence des marqueurs M1, de l'activation des astrocytes et de la mort neuronale dans le cerveau aboutissant à la diminution de la sévérité des symptômes.

L'étude de l'activation immunitaire chez les patients HSA, nous a permis d'observer une signature immunologique similaire à notre modèle murin. Nous avons montré que les patients HSA présentaient une augmentation des cellules immunitaires innées et une immunodépression lymphocytaire en comparaison avec des donneurs sains. Nous avons également décrit l'importance du grade et du genre des patients par la caractérisation d'un profil inflammatoire plus sévère chez les patients hauts gradés et chez les hommes.

Finalement, nos résultats confirment l'existence d'une signature immunologique similaire entre les patients HSA et notre modèle murin aboutissant, dans les deux cas, à l'augmentation de l'activation de l'inflammation systémique et cérébrale. Cette signature immunologique est dépendante du sexe et du grade des patients. La diminution de la gravité des symptômes par le traitement avec la protéine MFG-E8 dans notre modèle souris confirme l'implication incontestable de l'inflammation dans l'apparition des déficits moteurs secondaires à la mort neuronale, et le potentiel thérapeutique de cette protéine MFG-E8 dans le développement de nouvelles thérapies.

Mots-clés : Hémorragie sous-arachnoïdienne, inflammation cérébrale, immunité innée, insultes cérébrales précoces, ischémies cérébrales retardées, mort neuronale, MFG-E8.

Abstract

Subarachnoid hemorrhage (SAH) is a redoubtable pathology resulting frequently from the rupture of an intracranial aneurysm. It is associated to an important mortality and severe neurologic deficits. The bleeding leads to an increase in the intracranial pressure, to a decrease in cerebral blood flow, to the development of cerebral inflammation and to neuronal death. These events of early brain injury (first 72 hours) determine the patient's prognosis. The vasospasm was first thought to be the main cause of delayed cerebral ischemia (DCI), but its pharmacological decrease was not being associated to any benefits for the patients. However, rapid leucocytic infiltration in the CNS secondary to the bleeding seems implicated in the development of DCI.

Our hypothesis is that the early immune system activation in SAH is responsible for delayed neuronal death and for the onset of symptoms in SAH patients. Our goals were to characterize the contribution of leucocytes in cerebral inflammation and neuronal death in our SAH mice model, to modulate the inflammation by using MFG-E8 protein, an anti-inflammatory protein promoting the apoptotic clearance, and to confirm this similar immunologic signature in SAH patients.

Our mouse model allows us to surgically induce SAH and to inject the MFG-E8 protein by intraperitoneal injection. The cellular composition of blood (human and mouse) and of mouse brains were analyzed by flow cytometry. The plasma (human and mouse) and the cerebrospinal fluid (CSF) were analyzed by cytokine assay. Some mice brains were paraffin-embedded for confocal microscopy imaging. Microglia cell lines allowed us to evaluate the modulation of phagocytosis and reactive oxygen species (ROS) production secondary to the exposition to SAH patients' serum and CSF.

In the first study, we have demonstrated the impact of early cerebral inflammation on neuronal death and the occurrence of symptoms in SAH mice. We also have characterized the presence of systemic inflammatory markers in SAH patients.

In the second study, we have shown that MFG-E8 protein treatment in our SAH mice model is linked to a decrease in peripheric inflammation as well as to a decrease of M1 markers, astrocytic activation and neuronal death in the brain leading to a decrease of symptoms severity.

The study of immune activation in SAH patients allowed us to observe an immune signature like in our mouse model. We have revealed that SAH patients have an increase in innate immune cells and in lymphocytic immunosuppression in comparison to healthy donors. We have also described the importance of gender and SAH grade by the characterization of a more severe inflammatory profile in high-grade and in male patients.

To conclude, our results confirm the existence of a similar immune signature between SAH patients and our mouse model leading in both cases to an increase in systemic and cerebral inflammation. This immunologic signature depends on the patients' gender and on the grade of SAH. The decrease of symptom severity with MFG-E8 protein treatment in our mice model confirms the unquestionable implication of inflammation in the occurrence of motor deficits secondary to neuronal death and the therapeutic potential of MFG-E8 for the development of new therapies.

Keywords: Subarachnoid hemorrhage, cerebral inflammation, innate immunity, early brain injury, delayed cerebral ischemia, neuronal death, MFG-E8.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Liste des sigles	xii
Remerciements	ii
Introduction	1
1. Le système immunitaire et l'inflammation systémique.....	1
1.1. Définition des composantes du système immunitaire	1
1.2. Les récepteurs des cellules immunitaires du système inné	3
1.3. Les stratégies du système immunitaire inné	4
1.3.1. L'activation du système du complément.....	4
1.3.2. La phagocytose	7
1.3.3. L'apoptose	10
1.4. Les macrophages	12
1.4.1. Généralités et origine des macrophages	12
1.4.2. La plasticité et la polarisation des macrophages.....	14
1.4.2.1. Les macrophages M1	14
1.4.2.2. Les macrophages M2	17
1.4.2.3. La protéine MFG-E8	19
1.5. Les neutrophiles	22
1.6. Les cellules dendritiques	24
1.7. Les cellules natural killers.....	26
1.8. Le système immunitaire adaptatif.....	27
1.8.1. Les récepteurs du système immunitaire adaptatif	27
1.8.2. L'immunité cellulaire	28
1.8.3. L'immunité humorale	29

2.	La composante immunitaire du cerveau et l'inflammation cérébrale.....	31
2.1.	L'anatomie générale du cerveau	31
2.2.	La composante immunitaire du SNC	32
2.2.1.	La barrière hémato-encéphalique	32
2.2.2.	Les astrocytes	34
2.2.2.1.	Morphologie et physiologie des astrocytes	34
2.2.2.2.	Le rôle des astrocytes dans l'inflammation cérébrale	36
2.2.3.	La microglie.....	38
2.2.3.1.	Généralités et développement de la microglie	38
2.2.3.2.	Le rôle physiologique de la microglie dans l'élagage synaptique	39
2.2.3.3.	Le rôle physiologique de la microglie dans la mort cellulaire programmée	40
2.2.3.4.	Le rôle de la microglie dans l'inflammation cérébrale	40
3.	Les hémorragies sous-arachnoïdiennes.....	43
3.1.	La pathophysiologie de l'HSA	44
3.1.1.	Les lésions cérébrales précoces.....	44
3.1.2.	Les ischémies cérébrales retardées	45
3.2.	Les stratégies thérapeutiques essayées dans les HSA.....	46
4.	Hypothèse et objectifs de ce projet de recherche.....	48
Méthodologies		51
1.	Le modèle animal.....	51
1.1.	L'induction de l'HSA	51
1.2.	La réalisation des tests phénotypiques	55
1.3.	Les prélèvements sanguins dans la veine saphène	56
1.4.	Le sacrifice des souris	56
2.	La cytométrie en flux	57
2.1.	Les principes généraux de la cytométrie en flux	57
2.2.	La préparation des cellules du sang de souris	57
2.3.	La préparation des cellules du cerveau de souris.....	58
2.4.	La préparation des cellules de sang de prélèvements humain	58
2.5.	Les étapes communes du marquage de cytométrie en flux.....	59
3.	La méthode d'immunofluorescence.....	69
3.1.	Les généralités sur cette méthode	69

3.2.	La préparation des lames pour l'immunofluorescence	69
4.	Le recrutement des patients HSA.....	71
5.	Le dosage des cytokines	75
6.	La culture cellulaire.....	75
6.1.	L'entretien des cellules.....	75
6.2.	L'évaluation de la production de ROS	76
6.3.	L'évaluation de la capacité de phagocytose.....	76
7.	Les analyses statistiques	76
Étude de l'activation de l'immunité innée dans les lésions cérébrales précoces à la suite d'une hémorragie sous-arachnoïdienne (288).		79
1.	L'HSA est liée à l'activation inflammatoire systémique et périphérique dans notre modèle murin.	79
2.	L'HSA entraîne le recrutement précoce et l'activation des cellules immunitaires dans le cerveau.	82
3.	L'induction de l'HSA favorise l'activation tardive des astrocytes, de la microglie et de la mort neuronale.....	85
4.	L'induction de l'HSA cause l'apparition de déficits moteurs chez les souris.	90
5.	L'HSA est liée à la présence de marqueurs inflammatoires chez les patients.	91
Le traitement par la protéine MFG-E8 diminue l'activation du système immunitaire inné dans l'insulte cérébrale précoce secondaire aux HSA.....		97
1.	Le traitement par la protéine MFG-E8 est liée à la diminution de l'activation de l'inflammation systémique précoce chez les souris HSA.	97
2.	Le traitement par la protéine MFG-E8 diminue les macrophages pro-inflammatoires, l'activation des astrocytes, la mort neuronale et les déficits moteurs associés à l'HSA.	99
Étude de l'évolution des cellules immunitaires dans le sang de patients HSA.....		105
1.	Étude de l'évolution des cellules immunitaires dans le temps.	106

1.1.	Les patients HSA sont caractérisés par l'augmentation du pourcentage des cellules immunitaires innées.	106
1.2.	Les patients HSA de haut grade possèdent un profil inflammatoire plus persistant que les patients bas grade.	117
1.3.	Les patients HSA de sexe masculin ont un profil inflammatoire plus marqué que celui des femmes.	124
2.	Étude in vitro de l'impact inflammatoire du sérum et du LCR de patients HSA.	133
Discussion		141
Conclusion		165
Références		i

Liste des tableaux

Tableau 1.	Liste des Ac utilisés sur les cellules murines.....	60
Tableau 2.	Liste d'anticorps du panel humain « LT ».....	61
Tableau 3.	Liste d'anticorps du panel humain « LT régulateurs ».....	61
Tableau 4.	Liste d'anticorps du panel humain « Sécrétion des LT ».....	62
Tableau 5.	Liste d'anticorps du panel humain « Leucocytes ».....	62
Tableau 6.	Liste d'anticorps panel humain « Monocytes ».....	63
Tableau 7.	Liste d'anticorps du panel humain « LB ».....	64
Tableau 8.	Récapitulatif des Ac utilisés pour l'immunofluorescence.	71
Tableau 9.	Caractéristiques des participants de cette étude.....	74
Tableau 10.	Récapitulatif des différences entre le modèle murin HSA et les patients HSA....	116

Liste des figures

Figure 1.	Les voies d'activation du système du complément.....	6
Figure 2.	Les récepteurs et le principe de la phagocytose.....	9
Figure 3.	Les voies d'activation de l'apoptose.....	12
Figure 4.	Lien entre les voies du NFκB et de l'inflammasome.....	16
Figure 5.	L'activation et la polarisation des macrophages.....	19
Figure 6.	Schématisation de la double opsonisation et des rôles principaux de la protéine MFG-E8	21
Figure 7.	Le lien entre le système immunitaire inné et adaptatif.....	30
Figure 8.	La relation anatomique entre les méninges, les vaisseaux sanguins cérébraux et le parenchyme du système nerveux central	32
Figure 9.	Représentation schématique du principe de chirurgie	52
Figure 10.	Schéma expérimental des souris HSA	54
Figure 11.	Isolement des PBMC	59
Figure 12.	Stratégies de <i>gating</i> des analyses de cytométrie en flux pour les échantillons de souris.	65
Figure 13.	Stratégies de <i>gating</i> des analyses de cytométrie en flux pour le sang humain .	67
Figure 14.	Schéma expérimental des prélèvements des patients HSA.....	73
Figure 15.	L'HSA est liée à la modulation systémique des cytokines inflammatoires et des neutrophiles circulants.	81
Figure 16.	L'induction de l'HSA est associée à l'augmentation des neutrophiles, de l'ensemble de la microglie activée et des macrophages ainsi que des monocytes pro-inflammatoires dans le cerveau.	84
Figure 17.	L'induction de l'HSA est liée à l'activation locale de la microglie, des astrocytes et de la mort neuronale.....	87
Figure 18.	Quantification des neurones apoptotiques (24h) et de l'activation de la microglie (7j) dans le cerveau de souris.....	89
Figure 19.	L'induction de l'HSA cause l'apparition de déficits moteurs.	90
Figure 20.	Évolution des cytokines plasmatiques des patients HSA au cours du temps. ..	93

Figure 21.	Évolution des cytokines inflammatoires en fonction du pronostic des patients HSA.	95
Figure 22.	Quantification du niveau de cytokines chez les souris HSA traitées au PBS ou au MFG-E8 7j après l'induction de l'HSA.....	98
Figure 23.	Étude du rôle du traitement avec la protéine MFG-E8 dans notre modèle d'HSA sur les souris.	101
Figure 24.	Évolution des LT CD4 ⁺ au cours du temps chez les patients HSA.....	108
Figure 25.	Évolution des LT CD8 ⁺ au cours du temps chez les patients HSA.....	111
Figure 26.	Évolution des autres leucocytes au cours du temps chez les patients HSA....	114
Figure 27.	Évolution des LT CD4 ⁺ en fonction du grade des patients HSA.....	118
Figure 28.	Évolution des LT CD8 ⁺ en fonction du grade des patients HSA.....	120
Figure 29.	Évolution des autres leucocytes en fonction du grade des patients HSA.	122
Figure 30.	Évolution des LT CD4 ⁺ en fonction du genre des patients HSA.....	125
Figure 31.	Évolution des LT CD8 ⁺ en fonction du genre des patients HSA.....	127
Figure 32.	Évolution des autres leucocytes en fonction du genre des patients HSA.	130
Figure 33.	Évaluation de la capacité de production de ROS.....	135
Figure 34.	Évaluation de la capacité de phagocytose.....	137
Figure 35.	Résumé de l'implication des cellules immunitaires dans l'HSA.....	163

Liste des sigles

Ac : Anticorps	CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
ACK : Ammonium Chloride Potassium buffer	CPA : Cellule présentatrice d'AG
ADN : Acide désoxyribonucléique	CR : Récepteur du système du complément
AG : Antigène	CRP : C-reactive protein
AIF : Facteur inducteur de l'apoptose	CXCL10 : C-X-C motif chimiokine ligand 10
AKT : Serine/threonine kinase	CXCR : C-X-C Motif chemokine receptor
ANOVA : Analyse de la variance	DAMPs : Danger-associated molecular patterns
Apaf : Apoptotic protease activating factor	DAP : Protéine d'adaptation
AQP4 : Aquaporine 4	DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
ASC : Activating recruitment domain	DC : Cellules dendritiques
ATCC : American type culture collection	DCI : <i>Delayed cerebral ischemia</i> : Ischémies cérébrales retardées
ATP : Adénosine triphosphate	DD : Death domain
BCR : B-cell receptor	DED : Domaines effecteurs de mort
bFGF : Basic fibroblast growth factor	DHR : Dihydrorhodamine 123
BG : Bas grade	EBI : <i>Early brain injury</i> : Lésions cérébrales précoces
BHE : Barrière hémato-encéphalique	EDTA : Acide ethylenediaminetetraacetic
CARD : Caspase activation and recruitment domain	EMEM : Eagle's minimum essential medium
CCL2 : C-C motif chemokine ligand 2 :	ET-1 : Endothéline-1
CCR : CC chemokine receptor	FACS : Fluorescence-activated cell-sorting
CD : Cluster de différenciation	FADD : Fas associating protein with death domain
CHUM : Centre hospitalier de l'Université de Montréal	FBS : Fetal bovine serum
CIPA : Comité institutionnel de protection des animaux	Flt-1 : FMS-related tyrosine kinase 1
CRCHUM : Centre de recherche du CHUM	
CLD : Claudine	

fMLP: Récepteurs aux peptides bactériens formylés
FoxP3 : Forkhead box P3
GFAP: Glial fibrillary acidic protein
GM-CSF : Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
H : Heure
HBSS : Hank's balanced salt solution
HG : Haut grade
HIF : Facteur induit par l'hypoxie
HLA-DR : Human leukocyte antigen-DR isotype
HMC3 : Human microglia clone 3
HMGB-1: High mobility group box-1
HOCl : Acide hypochlorique
HSA : Hémorragies sous-arachnoïdiennes
Iba-1: Ionized calcium-binding adapter molecule 1
ICAM : Intercellular adhesion molecule
DCI : Ischémies cérébrales retardées
IFN : Interféron
IκB : Inhibitor of NFκB
IκK : IκB kinase
IL : Interleukine
iNOS: Inducible nitric oxyde synthase
IP-10 : Interferon-inducible protein 10
IP : Intrapéritonéal
IRAK : IL-1 receptor associated kinase
IRF3 : Interferon regulatory transcription factor 3
J : Jour

JAM : Junctional adhesion molecules
JAK : Kinase Janus
K : Potassium
KO : Knock-out
LB : Lymphocytes B
LCR : Liquide céphalorachidien
LPS : Lipopolysaccharides
LRR : Leucin-rich repeat
LT : Lymphocytes T
LTC : Lymphocytes T cytotoxiques
MAPK : Mitogen associated protein kinases
MASP : Mannan-binding lectin serine protease
MBL : Mannose binding lectin
MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1
MDC : Macrophage-derived chemokine
MFG-E8 : Milk fat globule-epidermal growth factor 8
MIP : Macrophage-inflammatory protein
MN : Milieu normal
MSD: Meso scale discovery
mTOR : Mechanistic target of rapamycine
MyD88 : Myeloid differentiation factor-88
Na : Sodium
NACHT : Domaine de fixation et d'oligomérisation nucléotidique
NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NETs : Neutrophil extracellular traps
NeuN : Neuronal nuclei

NFκB : Nuclear factor-κ B
NK : Natural killers cells
NLR : NOD like receptor
NLRP3 : Nucleotide-binding oligomerization domain-, leucine-rich repeat- and pyrin domain-containing 3
NO : Oxide nitrique
PAMPs : Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PBMC : Cellules mononuclées sanguine périphériques
PBS : Phosphate buffered saline
PD-L : Programmed death-ligand
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PIC : Pression intracrânienne
PIGF : Placental growth factor
PRR : Pattern recognition receptor
Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RhoA : Ras homolog family member A
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
Rpm : Rotations par minute
RPMI : Roswell park memorial institute
Runx1 : Runt-related
SAA : Serum amyloid A
SEM : Erreur standard à la moyenne
SNAREs : Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptors
SNC : Système nerveux central
STAT : Signal transducer and activator of transcription
SOCS : Suppressor of cytokine signaling 3
SOD : Superoxyde dismutase
TARC : Thymus and activation-regulated chemokine
TCR : T-cell receptor
TGF-β : Transforming growth β
Th : Lymphocytes T helpers
Tie : Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains
TIR : Toll/IL-1 receptor
TLR : Toll-like receptors
TNF : Tumor necrosis factor
TRAF6 : Tumor necrosis factor receptor associated factor 6
TREM2 : Triggering receptor expressed on myeloids cells 2
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
VCAM : Vascular cell adhesion molecule
VEGF : Vascular endothelial growth factor
WFNS : World federation of neurological surgeons
WT : Wild-Type
Ym1 : Chitinase-like protein

Remerciements

En premier lieu, il me sera difficile d'établir une liste exhaustive de toutes les personnes que je veux remercier.

Je tiens, tout d'abord, à remercier le Dr Jean-François Cailhier pour m'avoir accepté en stage de Master 2, puis comme étudiante au Doctorat. Merci pour ton accueil et ton soutien durant toutes ces années. Tu as su me guider et me soutenir pendant ce projet de doctorat. Merci pour ces nombreux échanges scientifiques enrichissants autour de bons vins et fromages. Merci pour ta bonne humeur constante et ton humour à toute épreuve. Tu as été un mentor et un deuxième papa tout au long de cette aventure.

Je suis aussi entièrement reconnaissante envers Patrick Laplante, attaché de recherche dans ce laboratoire, pour m'avoir encadrée et formée. Tu m'as épaulée et guidée quotidiennement tout au long de ce projet. Merci de m'avoir remonté le moral quand je ne l'avais plus. Merci de m'avoir orientée quand je ne savais plus dans quelle direction aller. Merci d'avoir été un si bon ami en plus de mon responsable durant ce doctorat.

Merci à mon conjoint, futur médecin et ancien étudiant du laboratoire Frédéric Brillant-Marquis. Tu as été un soutien infaillible depuis notre rencontre, tant au niveau professionnel qu'au niveau personnel et émotionnel. Je n'y serais jamais arrivée sans toi. Je suis éternellement reconnaissante pour ton aide et ton appui, en plus des nombreuses fois où tu m'as rejointe au laboratoire, car je devais finir tard. Merci d'avoir rendu cette aventure plus facile.

Je voudrais également adresser un immense remerciement à Paméla Thébault, attachée de recherche dans le laboratoire de Réjean Lapointe et responsable de la plateforme de cytométrie en flux. Merci pour tes formations continues (pratiques et théoriques) sur la cytométrie en flux. Merci d'avoir toujours été présente dans les moments difficiles et de m'avoir épaulée, écoutée, guidée et aidée tant de fois durant ces dernières années. Tu as été un pilier émotionnel et professionnel pour moi. Merci !

Merci aux différents stagiaires (Frédéric, Benjamin, Benoît et Ana) pour votre aide et pour avoir apporté tant de bonne humeur et de convivialité dans ce laboratoire.

Enfin, je voudrais remercier l'équipe de la plateforme de pathologie moléculaire du CRCHUM pour leur aide durant ce projet. Merci aux services de neurochirurgie et de soins intensifs du CHUM pour leur participation au recrutement de patients. Je voudrais tout particulièrement remercier les docteurs Francoeur, Bojanowski et Stevens pour leurs aides dans la collecte et les analyses statistiques des données des patients.

Merci à l'Institut du Cancer de Montréal pour l'accueil chaleureux et pour créer un environnement de travail convivial et stimulant pour les étudiants. Merci à mes parents pour leur soutien à tous les niveaux, malgré la distance, vous avez toujours été là pour moi. Merci à mes frères et leurs compagnes, ainsi qu'à toute ma famille pour votre soutien à distance et vos rires !

C'est grâce à vous tous que cette thèse a pu être écrite, mille mercis !

Introduction

1. Le système immunitaire et l'inflammation systémique

1.1. Définition des composantes du système immunitaire

Le système immunitaire représente l'ensemble des organes, des tissus et des cellules qui ont pour fonction la défense du corps humain contre une agression externe par un pathogène ou la protection contre les cellules anormales. Les cellules immunitaires sont appelées leucocytes ou globules blancs et dérivent toutes de l'hématopoïèse dans la moelle osseuse. Le système immunitaire est classiquement séparé en deux systèmes : l'immunité adaptative et l'immunité innée.

Le système immunitaire inné est défini par son action immédiate et non spécifique face à un agresseur. Il a pour but d'éliminer rapidement et efficacement un pathogène entrant dans l'organisme ou de répondre à une situation de danger cellulaire. Les cellules effectrices de l'immunité innée dérivent de la lignée myélocytaire de l'hématopoïèse. Elles peuvent être résidentes des tissus ou circulantes dans le sang et ont pour fonction la surveillance et l'action rapide en cas de détection d'un pathogène ou d'un danger cellulaire grâce à leurs nombreux récepteurs de surface. Les cellules résidentes sont les macrophages et les cellules dendritiques (1). Elles sont les premières à intervenir en cas de stress tissulaire ou d'entrée d'un pathogène dans le tissu cible. Les cellules circulantes du sang sont les neutrophiles et les monocytes (2).

Au contraire, le système adaptatif est spécifique et plus long à mettre en place. Ce système repose sur les organes lymphoïdes, les lymphocytes T (LT) et les lymphocytes B (LB). Il permet la reconnaissance spécifique d'un pathogène et le déclenchement de réponses spécifiques contre ce dernier (3).

L'inflammation est le processus universel et ubiquitaire par lequel les systèmes immunitaires inné et adaptatif répondent aux agressions. Elle est définie par l'apparition de chaleur, douleur, rougeur et gonflement au niveau de la zone inflammée. Ces effets sont la conséquence d'une vasodilatation locale et de l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins. Cela facilite la libération et le passage des cellules immunitaires, des messagers moléculaires et des fluides du système sanguin vers le tissu cible (4).

En général, les réponses immunitaires dépendent de la communication entre les cellules immunitaires et le microenvironnement. Cette communication est permise par la sécrétion de petites protéines appelées cytokines. D'ailleurs, on appelle « cytokine », toute protéine sécrétée par les cellules immunitaires qui influe sur le comportement des cellules voisines portant les récepteurs adéquats. La liaison de la cytokine sur son récepteur induit des signaux d'activation, de prolifération, de différenciation ou de mort cellulaire chez la cellule cible. Les cytokines agissent en cascade, ce qui signifie que les cellules qui répondent aux cytokines sont elles-mêmes la source de production de cytokines (5). Les cytokines possèdent un effet redondant, car plusieurs cytokines peuvent partager la même fonction. En réalité, le terme cytokine est un nom générique. On parle de lymphokine pour les cytokines sécrétées par les lymphocytes, de monokines pour les cytokines sécrétées par les monocytes, d'interleukines (IL-) pour les cytokines qui sont sécrétées par les leucocytes et qui agissent sur d'autres leucocytes ainsi que de chimiokines pour les cytokines qui ont des actions chimiotactiques (6). Les chimiokines dont le nom dérive du raccourcissement de l'expression des cytokines chimioattractives, sont des petites protéines sécrétées de taille variable (entre 8 et 14 kilodalton), capables d'induire la migration des leucocytes. Elles sont classées en 4 sous-types en fonction de la structure primaire, du nombre et de l'espacement de leurs motifs cystéine. Pour identifier les ligands des récepteurs, un L ou un R sont rajoutés à cette nomenclature (7). Les cytokines peuvent avoir différents modes d'action. On parle de mode d'action autocrine quand elles agissent directement sur la cellule qui les sécrète. Elles peuvent agir par un mode d'action paracrine lorsqu'elles influent sur les cellules voisines ou encore via un mode d'action endocrine si leur action est sur des cellules éloignées (8). Les cytokines sont généralement divisées en cytokines pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires. Leur étude par leur dosage dans les prélèvements humains ou sur des modèles animaux permet de caractériser le niveau inflammatoire des sujets.

La résolution de l'inflammation est un mécanisme indispensable pour le retour à l'homéostasie qui prévient l'inflammation chronique et active la réparation tissulaire. Cette résolution implique le renversement de la perméabilité capillaire, le drainage lymphatique de l'œdème et des leucocytes ainsi que la reprogrammation des macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire promouvant la phagocytose des débris cellulaires et des cellules apoptotiques. Selon la capacité de régénération des tissus, la phase de réparation peut favoriser

le retour à une architecture tissulaire quasi identique à l'état initial ou à la formation d'une cicatrice par le remplacement du tissu lésé par du collagène. Le tissu endommagé ne retrouve alors pas sa fonction initiale (9, 10).

1.2. Les récepteurs des cellules immunitaires du système inné

Les cellules immunitaires du système inné sont capables de discriminer les cellules du non-soi et les cellules du soi anormales grâce à une panoplie de récepteurs qu'elles expriment, appelés *pattern recognition receptor* (PRR). Les PRR sont des récepteurs qui peuvent être localisés dans le cytoplasme, au niveau des membranes plasmiques ou dans les endosomes cellulaires (11). Ces récepteurs sont codés par un nombre limité de gènes invariants et reconnaissent des motifs moléculaires simples, uniques et spécifiques des pathogènes : *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs). Les PRR reconnaissent aussi des signaux de dommages cellulaires (DAMPs). Ces DAMPs ou alarmines sont des molécules normalement intracellulaires, comme l'adénosine triphosphate (ATP) ou l'acide désoxyribonucléique (ADN). Leur présence dans le milieu extracellulaire est perçue comme un message d'alarme par les cellules voisines et indique l'existence de dommages cellulaires (12).

Les *toll-like receptors* (TLR) sont des glycoprotéines transmembranaires qui forment le sous-groupe majeur et le plus étudié des PRR. Leur nom dérive d'un gène du même nom chez la drosophile (13). Ils sont constitués d'une partie extracellulaire contenant un domaine riche en leucine (LRR) pour la reconnaissance de leur ligand et un domaine intracellulaire de transduction du signal hautement conservé, le Toll/IL-1 receptor (TIR) (14). Il existe 13 types de TLR chez les mammifères, dont les 10 premiers sont exprimés chez les humains (15). Leur classification dépend de la nature des PAMPs reconnus et de leur localisation extracellulaire (TLR 1-2-4-5-6-10-11-12-13) ou intracellulaire (TLR 3-7-8-9) (16). La fixation d'un ligand sur un TLR par l'interaction avec les PAMPs entraîne la dimérisation de deux TLR (de façon homo- ou hétérodimérique), ainsi qu'un changement de conformation qui aboutit au recrutement de différentes protéines d'adaptation responsables de la transduction intracellulaire du signal et de l'activation des voies de signalisations spécifiques. Ces voies de signalisations spécifiques seront développées ultérieurement dans ce manuscrit.

Les *NOD like receptor* (NLR) sont des récepteurs cytoplasmiques qui permettent la reconnaissance d'une invasion intracellulaire (17).

Les récepteurs du système du complément (CR) et du fragment Fc des immunoglobulines sont déterminants pour le phénomène d'opsonisation. Les immunoglobulines sécrétées par les LB ou les petits fragments C3a et C5a du système du complément peuvent se fixer à la membrane du pathogène ou de la cellule à éliminer. Ils sont alors reconnus par leurs récepteurs spécifiques à la surface des phagocytes et facilitent la prise en charge des cellules à éliminer augmentant ainsi l'efficacité de la phagocytose (18).

Toutes les cellules nucléées de l'organisme expriment le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Celui-ci sert de carte d'identité aux cellules. Le CMH I est reconnu par les LT qui discriminent les cellules du soi, du non-soi, ainsi que les cellules anormales. Les macrophages, les LB et les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Elles jouent un rôle important dans la présentation d'antigène (AG) du non-soi lors d'une invasion. Les phagocytes, grâce à leur CMH de classe II, présentent aux lymphocytes des fragments d'AG des particules qu'elles ont phagocytées. Ce phénomène permet l'orchestration des réponses immunitaires et l'activation du système immunitaire adaptatif en cas de besoin (19).

1.3. Les stratégies du système immunitaire inné

Les principales stratégies du système immunitaire inné reposent sur l'activation du système du complément pour l'activation des cellules immunitaires et l'élimination des cellules apoptotiques ou des débris cellulaires par la phagocytose.

1.3.1. L'activation du système du complément

Le système du complément est un ensemble de protéines plasmatiques appartenant au système immunitaire inné. C'est le système de défense contre les pathogènes le plus ancien de l'évolution. Il a été décrit pour la première fois au 19^e siècle et nommé par Paul Ehrlich en 1890 (20). Il permet, entre autres, la formation d'un complexe d'attaque membranaire responsable de la mort de la cellule cible. Il y a trois voies différentes d'activation de ce système du complément qui convergent vers une voie commune.

La voie classique est activée par la présence d'un complexe anticorps (Ac)/AG. Le complexe C1 est composé de 3 sous-unités. La première sous-unité est le C1q qui reconnaît et se fixe sur le complexe Ac/AG, ce qui active la sous-unité C1r qui clive le C1s et provoque le début de la cascade de protéolyse. La sous-unité C1s activée clive la protéine C4 en deux fragments, le C4a et le C4b. Le fragment C4b se fixe sur la cellule à lyser, recrute la protéine C2 et la clive en deux fragments, le C2a et le C2b, permettant la formation du complexe C4b2b aussi appelé la C3 convertase (21). La suite des étapes forme la voie commune d'activation du système du complément, car elle représente le moment de convergence des trois voies d'activation. La C3 convertase clive la protéine C3 en deux fragments : C3a et C3b. Le fragment C3b se fixe au complexe et forme le complexe C4b2b3b aussi appelé C5 convertase. La C5 convertase clive la protéine C5 en deux fragments : C5a et C5b. La fixation du fragment C5b aboutit à la formation du complexe C4b2b3b5b. Ce complexe recrute les protéines C6, C7, C8 et C9 et forme le complexe d'attaque membranaire qui conduit à la création d'un pore dans la membrane de la cellule cible et sa lyse (Fig.1) (22).

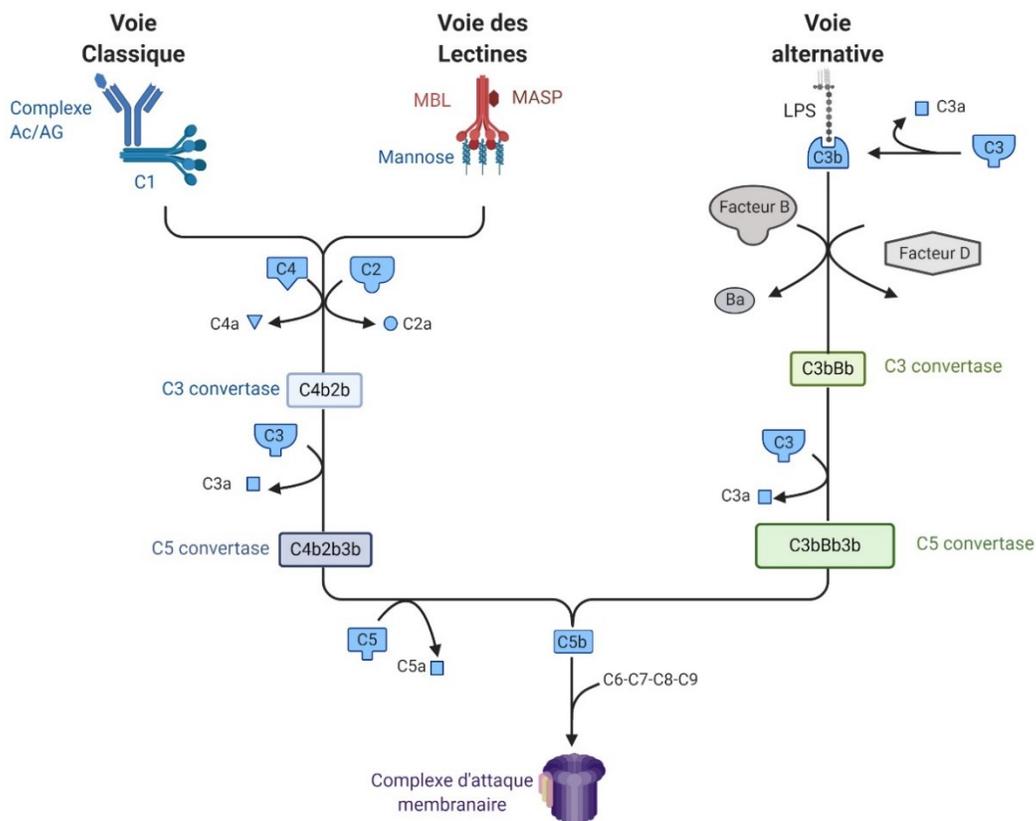
Le second type d'activation est la voie des lectines grâce à la présence d'une protéine globulaire dont la structure est homologue à celle du C1q : la *mannose binding lectine* (MBL). Cette MBL se fixe aux résidus mannose à la surface des pathogènes. Sa fixation entraîne l'activation des *mannan-binding lectin serine protease* (MASP)1 et MASP2 ou MASP3 qui clivent les protéines C4 et C2 pour rejoindre la voie commune (Fig.1) (23).

Le troisième mode d'activation du système du complément est la voie alternative. Celle-ci est activée par la présence des lipides, des carbohydrates ou des protéines spécifiques à la surface des pathogènes sur lesquels peuvent se fixer des fragments C3b circulants pour activer directement la voie commune (24). Les fragments C3b proviennent de l'hydrolyse constante et spontanée de la protéine C3 dans le système sanguin. Les fragments C3b circulants reconnaissent et se fixent sur la cellule cible entraînant le recrutement des deux facteurs (B et D) et la formation du complexe C3bBb, une autre forme de C3 convertase. L'hydrolyse et la fixation d'un autre petit fragment C3b permettent la formation du complexe C3bBb3b, une forme de C5 convertase qui rejoint la voie commune du système du complément (Fig.1) (25).

Les petits fragments C3a et C5a libérés dans le système sanguin sont appelés anaphylatoxines. Les anaphylatoxines possèdent de nombreuses fonctions dans l'inflammation.

Elles peuvent se fixer sur les cellules cibles et servir de signal (« mange-moi ») pour les phagocytes possédant le CR correspondant. Cette opsonisation, comme déjà mentionnée dans la partie précédente permet d'augmenter la capacité de phagocytose par les phagocytes professionnels (18). Les anaphylatoxines jouent également un rôle de chimioattraction pour guider les phagocytes (macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques) vers le site inflammatoire (26).

Figure 1. Les voies d'activation du système du complément



Légende Fig.1. Schématisation des trois voies d'activation du système du complément *inspirée et modifiée avec autorisation de (27).*

L'activation du système du complément est possible via trois voies différentes. La première est la voie classique qui, à la suite de la fixation de la protéine C1 sur le complexe Ac/AG, aboutit à la formation du complexe d'attaque membranaire. La voie des lectines est très similaire à la voie classique, mais son initiation dépend de la fixation du MBL et du MASP sur un résidu mannose. La troisième voie, la voie

alternative, débute par la fixation du fragment C3b sur le LPS ou d'autres résidus spécifiques des pathogènes.

1.3.2. La phagocytose

La phagocytose a été découverte en 1882 par Ilya Ilitch Metchnikov, le père fondateur de la notion d'immunité innée et récipiendaire d'un prix Nobel en 1908 pour son travail sur l'immunité (28). Son nom provient du grec « Phagos » pour manger et « Cytos » pour particule. C'est donc une forme d'endocytose par laquelle les phagocytes vont ingérer des particules étrangères, des débris ou des cellules entières, dont la taille est supérieure à 0,5µm. Elle permet l'internalisation de la cible par sa séquestration et sa digestion dans des vacuoles intracellulaires appelées phagosome.

D'un point de vue évolutif, ce processus est apparu bien avant la réponse immunitaire. Le premier organisme unicellulaire à utiliser la phagocytose est l'amibe pour l'ingestion des nutriments nécessaires à sa survie. L'évolution du phagosome dans cette amibe est similaire à celle observée pour la phagocytose immunitaire (29) suggérant une haute conservation de ce système. Chez les êtres multicellulaires comme le nématode *Caenorhabditis elegans*, ce processus est essentiel en condition physiologique pour le renouvellement et l'homéostasie tissulaire (30). En effet, le renouvellement tissulaire est naturellement dépendant de la mort cellulaire par apoptose et de la clairance apoptotique par phagocytose. La clairance apoptotique est également d'une importance capitale chez les mammifères au cours de l'embryogenèse (31). La phagocytose immunologique permet la protection contre une invasion pathogène, mais aussi la résolution de l'inflammation (32).

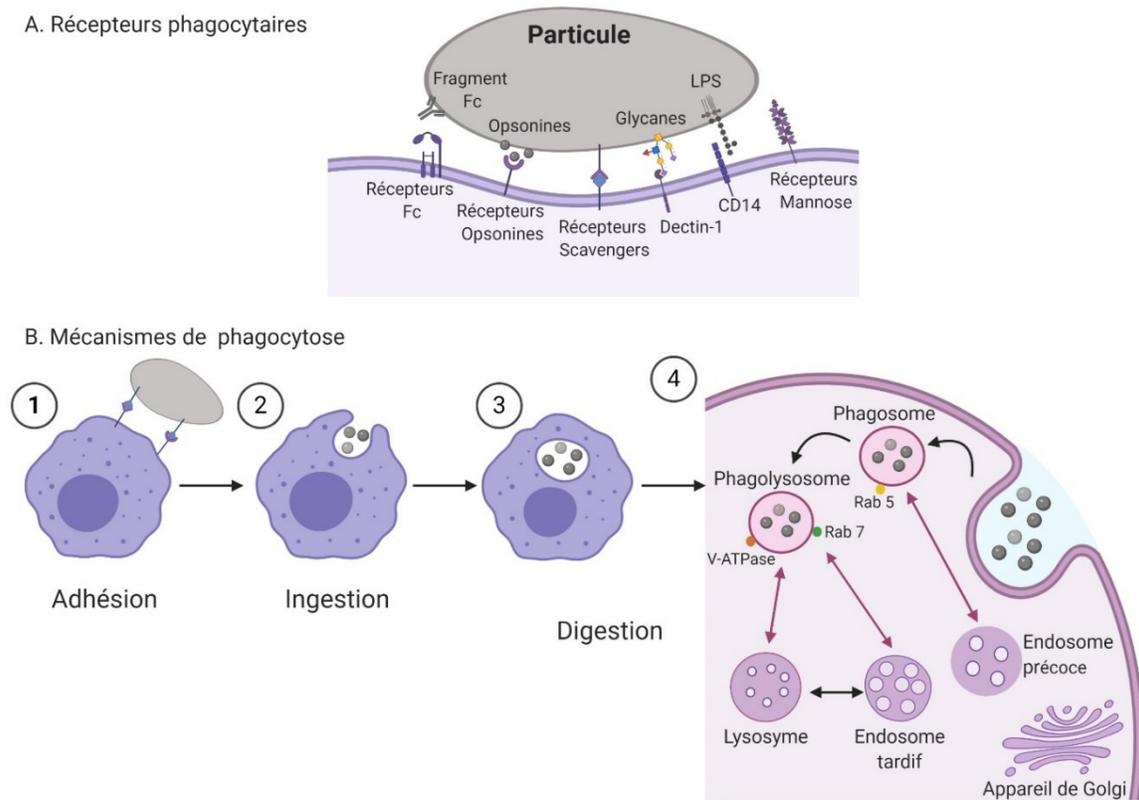
La phagocytose se déroule en 3 étapes : l'adhésion, l'ingestion et la digestion. Les phagocytes, par leurs récepteurs [Dectin-1, récepteurs au mannose, cluster de différenciation (CD)-14 ou *scavengers receptor*] reconnaissent les pathogènes, les opsonines ou les fragments Fc des immunoglobulines comme un signal « mange-moi » et entrent en contact avec la membrane cible (Fig.2A). Cette reconnaissance active des voies de signalisations impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, du trafic membranaire, de la formation de substances microbicides, de la présentation antigénique ainsi que de la synthèse de cytokines et de chimiokines inflammatoires. De manière plus précise, la liaison du ligand au récepteur initialise la polymérisation de l'actine qui par un mouvement rétrograde des membranes, stimule

l'émission de prolongements cytoplasmiques chez les phagocytes. Ces prolongements cytoplasmiques entourent progressivement la cellule cible et l'internalisent pour achever la formation d'une vacuole appelée phagosome. Une fois formé dans le cytoplasme, le phagosome se libère de son cytosquelette d'actine par dépolymérisation rapide. Des lysosomes et des endosomes provenant du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi peuvent fusionner et déverser leur contenu dans le phagosome. Cette étape permet la formation du phagolysosome. Le processus de fusion dépend des cibles moléculaires, des protéines *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptors* (SNAREs), et des promoteurs de fusion que sont les protéines GTPasiques de la superfamille Ras (33). Du fait de la fusion avec la voie endosomale, le phagosome exprime différentes protéines de cette voie. Durant la phase précoce de la phagocytose, le phagosome exprime Rab5, un marqueur des endosomes précoces. Pendant la phase tardive, il exprime Rab7, un marqueur des endosomes tardifs (34). L'acidification du milieu est tributaire de l'ATPase de type vacuolaire (V-ATPase), une enzyme qui permet l'entrée active des protons (H^+) dans le phagosome. Cette acidification achève l'activation des peptides antimicrobiens et des enzymes permettant la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'oxyde nitrique (NO) qui attaquent et détruisent la cellule cible (Fig.2B). La phagocytose est finalement un mécanisme dynamique de fusion et de fission membranaire entre le phagosome et les vacuoles du phagocyte (33). Divers noms ont été adoptés dépendamment des particules ingérées comme celui d'efférocytose pour l'élimination des cellules apoptotiques (35). Le terme « synapse phagocytaire », en référence au terme de « synapse immunologique » (contact entre les cellules T et le CMH II), est parfois utilisé pour définir la zone de contact entre les récepteurs phagocytaires et leur cible (33).

La pinocytose est un genre d'endocytose qui permet la capture des molécules et des fluides extracellulaires environnants. On parle de macropinocytose, si la formation des vésicules est actine dépendante et aboutit à la formation du macropinosome dont le diamètre peut varier de 0,5 à 5 μm (36). Cette forme de pinocytose est utilisée par différents types cellulaires et permet la prise en charge de diverses particules, dont les virus. Chez les cellules dendritiques, cette macropinocytose joue un rôle important dans la présentation antigénique (37). Le mécanisme d'endocytose clathrine-dépendant favorise l'ingestion des métabolites, des hormones, des protéines ou des virus. Les molécules cibles sont reconnues par des récepteurs

spécifiques sur les phagocytes. L'activation de ces récepteurs permet la fixation des adaptines, des clathrines et l'invagination membranaire. La vésicule formée dans le cytoplasme perd son manteau de clathrines et fusionne avec la voie endosomale (38). Le mécanisme d'endocytose cavéole-dépendant se termine par la formation de vésicules de 50 à 80 nm de diamètre contenant des petites molécules au niveau des radeaux lipidiques des membranes plasmiques. Les cavéolines qui enveloppent la vésicule formée restent accrochées à la membrane plasmique (39).

Figure 2. Les récepteurs et le principe de la phagocytose



Légende Fig.2. Représentation schématique des récepteurs et du principe de phagocytose *inspirée et modifiée avec autorisation de (40) et de (41).*

Fig.2A. Schéma des différents récepteurs phagocytaires. Les récepteurs des fragments Fc reconnaissent les immunoglobulines qui agissent par opsonisation de la particule à éliminer. Les récepteurs à opsonines peuvent, par exemple, reconnaître les petits fragments du système du complément. Les récepteurs *scavengers* ou récepteurs éboueurs reconnaissent les lipoprotéines de basse densité modifiées par oxydoréduction ou acétylation. Le récepteur Dectin-1 reconnaît les glycanes. Le récepteur CD14 reconnaît les lipopolysaccharides (LPS). Les récepteurs au mannose reconnaissent les ligands

mannosylés.

Fig.2B. Étapes principales de la phagocytose : adhésion, ingestion et digestion de la particule à éliminer, ainsi que le phénomène de fusion avec la voie endosomale pour l'optimisation de la digestion phagocytaire.

1.3.3. L'apoptose

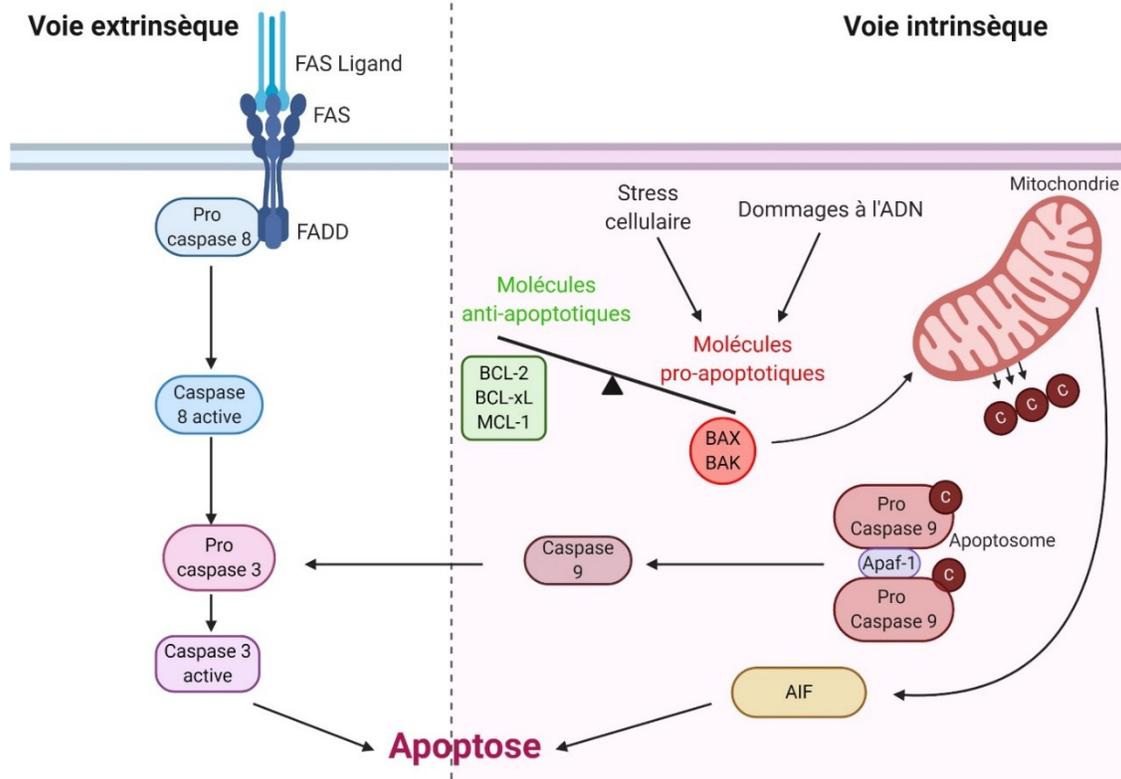
L'apoptose a été décrite pour la première fois en 1972 par John Kerr, Andrew Wyllie et Alastair Currie (42). C'est un processus de mort cellulaire programmée considéré comme propre, car toutes les membranes de la cellule apoptotiques sont conservées, limitant ainsi la libération des éléments cytoplasmiques dans le milieu extracellulaire et les réactions inflammatoires (43). On parle de mort propre par opposition à la nécrose qui est une mort hautement inflammatoire. L'apoptose est un suicide cellulaire en réponse aux stimuli environnants (physiologiques, cytotoxiques ou pathogéniques), dont l'importance est cruciale pour le maintien de l'homéostasie cellulaire (44). Elle permet une régulation fine de la taille des organes ou des tissus, mais elle est aussi impliquée dans la protection des organismes contre les cellules menaçant l'homéostasie (45). L'apoptose est caractérisée par plusieurs étapes principales : la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, le bourgeonnement de la membrane plasmique menant à la formation des corps apoptotiques (46). Les cellules apoptotiques expriment à leur surface les phosphatidylsérines qui sont reconnues par les phagocytes comme des signaux « mange-moi » permettant leur élimination rapide et sans dommage (47). L'apoptose peut être activée selon deux voies : la voie extrinsèque dépendante des récepteurs de mort ou la voie intrinsèque mitochondriale (48). L'apoptose dépend des caspases. Les caspases sont des protéines hautement conservées et redondantes dans l'évolution. Il en existe une douzaine chez l'humain. Les caspases possèdent un site actif riche en cystéine et un site de clivage au niveau des liaisons Asp-X. La cascade protéolytique aboutissant à la mort cellulaire rend possible le passage d'une forme inactive (procaspase) à une forme active (caspase). On parle de caspases initiatrices (caspases 2, 8, 9 et 10) ou effectrices (caspase 3, 6 et 7) en fonction de leur place dans cette cascade. Les caspases initiatrices contiennent un domaine N-terminal de recrutement des caspases aussi appelé *caspase activation and recruitment domain* (CARD) et des domaines effecteurs de mort (DED) qui favorisent leurs recrutements et leurs activations dans des complexes enzymatiques (49).

La voie physiologique extrinsèque (Fig.3) fait intervenir la liaison d'un ligand pro-apoptotique (FAS Ligand) ou pro-inflammatoire comme le *tumor necrosis factor* (TNF) - α . Les récepteurs de mort sont appelés FAS et contiennent des domaines de mort cellulaire (*death domain*, DD) pour le recrutement des protéines cytoplasmique *Fas Associating protein with Death Domain* (FADD) qui, par leurs domaines DED, activent la procaspase 8 débutant ainsi la cascade protéolytique de la mort cellulaire. La caspase 8 clive la caspase 3 effectrice qui amorce la fragmentation de l'ADN cellulaire (50) .

La voie intrinsèque (Fig.3) est dite pathologique, car elle est activée par l'apparition de stress ou de dommages à l'ADN. Cette voie est activée par l'organelle de la mort cellulaire, la mitochondrie, et dépend de la protéine p53 (51). En réponse au stress perçu, la mitochondrie libère le cytochrome C dans le cytoplasme. Celui-ci se fixe sur une grosse protéine cytoplasmique : l'*apoptotic protease activating factor 1* (Apaf-1). Cette protéine contient le domaine CARD de recrutement des caspases et un site de fixation de l'ATP. La fixation du cofacteur ATP et son hydrolyse entraînent un changement de conformation de ce complexe protéique qui devient l'apoptosome (52). L'apoptosome active la procaspase 9 qui est la caspase initiatrice de cette voie. Ce complexe actif transforme la procaspase 3 en caspase 3 qui clive la procaspase 7 aboutissant à la mort cellulaire (53) .

L'apoptose peut être activée par une voie indépendante de celle des caspases (Fig.3) via la libération d'un facteur inducteur de l'apoptose (AIF). En cas de stress ou de dommages à l'ADN, il est libéré par la mitochondrie, passe dans le noyau pour activer la condensation de l'ADN et donc l'apoptose cellulaire (54).

Figure 3. Les voies d'activation de l'apoptose



Légende Fig.3. Schématisation de l'activation de l'apoptose *inspirée et modifiée avec autorisation du chapitre 9 (Apoptosis in Polycystic Kidney) de (55).*

L'apoptose peut être activée par la voie extrinsèque via la reconnaissance entre le récepteur FAS et son FAS ligand. Cette reconnaissance entraîne la cascade apoptotique des caspases. La deuxième voie est la voie intrinsèque. Si les conditions favorisent la formation de molécules pro-apoptotiques, l'apoptose est déclenchée par la libération du cytochrome C depuis la mitochondrie. Le cytochrome C forme l'apoptosome en se fixant sur la procaspase 9 et Apaf-1 et rejoint la cascade des caspases.

1.4. Les macrophages

1.4.1. Généralités et origine des macrophages

Les macrophages ont été découverts par Ilya Ilitch Metchnikov en 1905. Il observa que les macrophages provenant d'animaux infectés possédaient une importante capacité d'élimination des bactéries et proposa les bases du concept d'activation des macrophages (56). Les macrophages sont des grosses cellules immunitaires mononuclées résidentes de la plupart

des tissus. Ils colonisent les organes durant le développement embryonnaire depuis le sac embryonnaire vitellin et y jouent un rôle de senseur du microenvironnement (57). Les macrophages possèdent des fonctions spécifiques dépendantes de leur localisation. Ce sont des phagocytes professionnels surnommés « éboueurs » de l'organisme, car ils permettent la clairance des cellules apoptotiques et des débris cellulaires par phagocytose (58). Ils peuvent s'activer en cas d'infections ou de dommages cellulaires et sécréter des cytokines et chimiokines (59). Outre leur fonction dans l'immunité innée, les macrophages jouent un rôle dans la régulation de l'immunité adaptative par leur capacité de présentation d'antigènes aux lymphocytes (60). La rapidité de leur mode d'action est en partie due à leur capacité de libération des cytokines en réponse aux stimuli trouvés dans leur microenvironnement. Au contraire des LT, ils n'utilisent pas la formation et le stockage de matériel dans des granules de sécrétions (61). Ils jouent un rôle dans la régulation et la résolution de l'inflammation par la stimulation de la réparation tissulaire.

Les macrophages peuvent également dériver des monocytes qui sont leurs précurseurs immatures circulants dans le système sanguin. Ces monocytes, à la suite de la réception de certains signaux, entrent dans le tissu cible et s'y différencient en macrophages. Les monocytes circulants ne constituent pas une population cellulaire homogène. Ils sont divisés en sous-types selon l'expression de marqueurs de surface qui diffèrent en fonction des espèces. On parle de monocytes classiques et de monocytes non classiques (62). La notion de monocytes pro-ou anti-inflammatoires varie d'une espèce à l'autre. En effet, chez la souris, les monocytes classiques ($CD11b^+Ly6C^{high}$) sont considérés comme pro-inflammatoires et les monocytes non classiques ($CD11b^+Ly6C^{low}$) comme anti-inflammatoires (63). Chez l'homme, on catégorise trois sous-populations de monocytes : les monocytes classiques ($CD14^{high}CD16^-$), les monocytes intermédiaires ($CD14^{high}CD16^+$) et les monocytes non classiques ($CD14^{low}CD16^{high}$) (64). Les monocytes activés expriment en grande quantité le CMH II dont le *Human Leukocyte Antigen-DR Isotype* (HLA-DR) pour leur fonction de CPA, ainsi que les molécules de costimulation CD80 et CD86 pour le contact avec les LT. Ces monocytes activés peuvent également exprimer des marqueurs d'inhibition pour éviter une suractivation de la réponse immunitaire. C'est le cas du *Programmed Death-Ligand* (PD-L)-1, aussi appelé CD274, qui diminue l'activation des LT (65-69).

1.4.2. La plasticité et la polarisation des macrophages

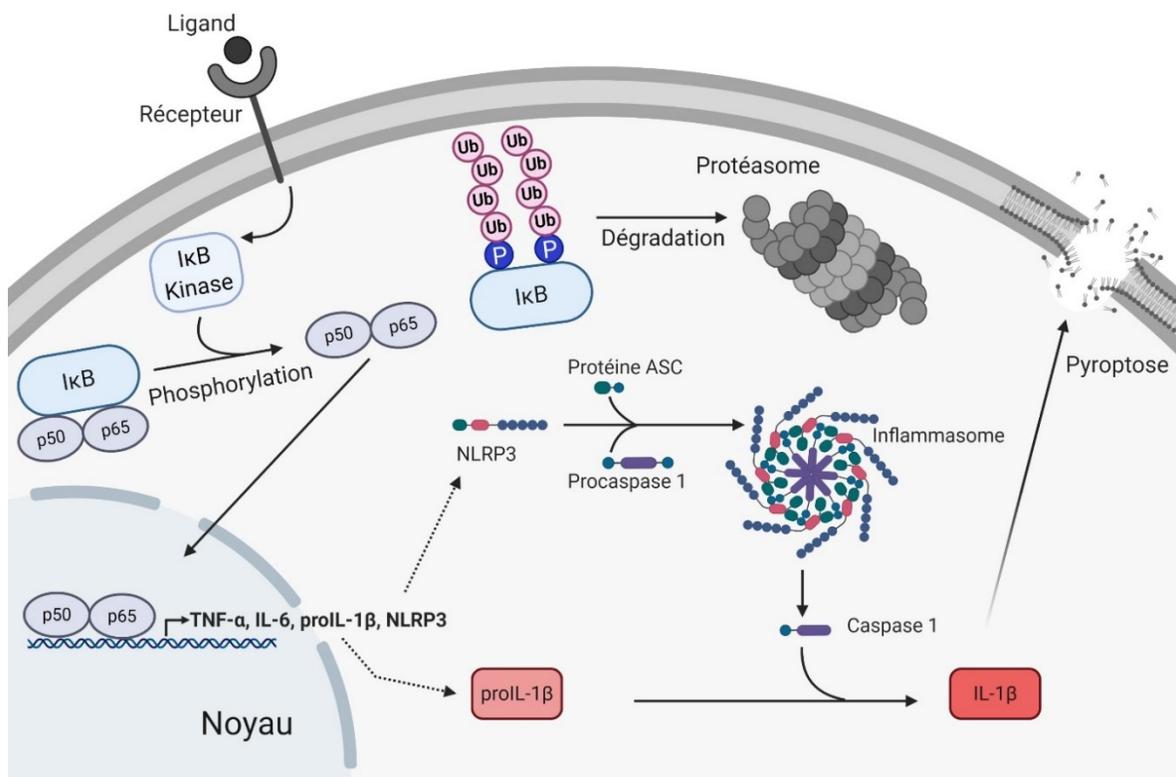
Les macrophages sont des cellules dotées d'une grande plasticité qui changent de phénotype en fonction des signaux trouvés dans leur microenvironnement. Ces signaux peuvent être des cytokines sécrétées par les cellules environnantes (signal paracrine) (70) ou par les macrophages eux-mêmes (signal autocrine) (71). La polarisation est le processus par lequel le macrophage se différencie en un phénotype particulier selon les signaux rencontrés dans son microenvironnement. En réalité, le macrophage peut prendre tout un spectre de phénotypes compris entre un profil pro-inflammatoire (M1) et un profil anti-inflammatoire M2 (72).

1.4.2.1. Les macrophages M1

Les macrophages M1 sont activés par la voie classique, par la reprogrammation via la présence dans le microenvironnement de cytokines sécrétées par les LT *helpers* (Th) 1 ou d'autres macrophages comme l'interféron (IFN)- γ et le TNF- α ou par la reconnaissance de marqueurs de surface spécifiques des bactéries comme le LPS. Les M1 sont recrutés précocement dans la phase inflammatoire (73). Ils sont spécialisés dans la production de facteurs pro-inflammatoires notamment par l'activation de la voie de signalisation du *nuclear factor- κ B* (NF κ B). Le NF κ B est composé de deux sous-unités (p50 et p65). Il stimule la transcription de gènes impliqués dans l'inflammation tels que des cytokines et des chimiokines (*C-X-C motif chemokine ligand 10* : CXCL10 et *C-C motif chemokine ligand 2* : CCL2) qui favorisent la migration et l'activation des cellules immunitaires via l'expression du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et le maintien de cette inflammation. Initialement, le NF κ B se trouve séquestré dans le cytoplasme par la fixation de l'inhibiteur du NF κ B (I κ B). L'activation du complexe I κ B kinase (I κ K) permet la phosphorylation, l'ubiquitination et l'envoi vers le protéasome de l'I κ B autorisant ainsi la libération du NF κ B et son entrée dans le noyau (Fig.4). Il peut alors y remplir sa fonction de facteur de transcription (74) et moduler l'expression des gènes de cytokines comme la proIL-1 β , l'IL-6, l'IL-12 et le TNF- α et de chimiokines impliquées dans l'activation des lymphocytes et leur polarisation Th1. Il possède un rôle dans l'activation des cellules *natural killers* (NK), dans l'augmentation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire, dans l'induction de l'expression des adhésines endothéliales favorisant l'adhérence et l'extravasation des leucocytes ainsi que dans l'apparition de la fièvre (75).

De récentes recherches se sont concentrées sur un complexe multiprotéique cytoplasmique qui semble fortement associé au développement de l'inflammation : l'inflammasome. Cette voie est activée chez les M1 (76). Le principal composant est le *nucleotide-binding oligomerization domain-, leucine-rich repeat- and pyrin domain-containing 3* (NLRP3) (77). Le NLRP3 est composé d'une extrémité N-terminale riche en purines (PYD) constituant le site de recrutement des caspases, d'une extrémité C-terminale riche en leucine (LRR) capable de reconnaître des ligands spécifiques tels que les PAMPs, et d'un domaine de fixation et d'oligomérisation nucléotidique (NACHT). Le domaine NACHT détient une activité ATPasique essentielle pour son auto-oligomérisation et le domaine PYD permet l'interaction protéine-protéine avec les protéines adaptatrices *activating recruitment domain* (ASC) (78). À l'état basal, les niveaux protéiques du NLRP3 sont très élevés démontrant son rôle crucial de senseur extracellulaire. Son activation est dépendante de l'activation de la voie NFκB favorisant la transcription du NLRP3 et de la proIL-1β. L'activation du NLRP3 entraîne son oligomérisation par ses domaines NACHT. Ceci permet l'agglutination des protéines adaptatrices ASC qui recrutent alors la procaspase 1 qui s'autoactive en caspase 1 fonctionnelle. Cette caspase 1 activée est capable de cliver les proIL-1β et proIL-18, les activant à leur tour (78). L'activation de la caspase 1 provoque une forme particulière de mort cellulaire : la pyroptose (Fig.4). Cette dernière est hautement inflammatoire, car elle entraîne la rupture de la membrane plasmique, la fragmentation de l'ADN ainsi que la libération des composants cellulaires et de l'IL-1β dans l'espace extracellulaire (79).

Figure 4. Lien entre les voies du NFκB et de l'inflammasome



Légende Fig.4. Schématisation du lien entre la voie du NFκB et celle de l'inflammasome *inspirée et modifiée avec autorisation de (80).*

L'activation de la voie du NFκB par la dégradation de l'IκB permet le passage du NFκB dans le noyau. Ce facteur de transcription augmente la production des cytokines pro-inflammatoires et du NLRP3. Le NLRP3 peut s'associer avec les protéines ASC et les procaspase 1 pour former l'inflammasome, un activateur de la caspase 1. Celle-ci permet l'activation de l'IL-1β qui est responsable de la pyroptose.

Les macrophages M1 ont une production augmentée de l'enzyme responsable de la production de NO hautement cytotoxique : *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). Ils détiennent une forte activité antimicrobienne, participent à l'élimination des pathogènes et jouent un rôle dans la production de ROS par l'activation de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (81). Les ROS sont des espèces chimiques actives dérivant de l'O₂ incluant le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'ion superoxyde (O₂⁻), et les radicaux libres (OH⁻) responsables de l'élimination des pathogènes pouvant entraîner la

survenue de l'inflammation chronique et des dommages cellulaires (82). Les M1 sont caractérisés par leur expression de CD14, CD16, CD64, CD80, CD86, TLR2 et TLR4 (73, 83).

Pour se protéger d'une suractivation inflammatoire et en fonction des signaux trouvés dans le microenvironnement, les M1 peuvent changer leur phénotype vers un sous-type M2 (Fig.5). On parle de reprogrammation en réponse à des stimuli comme la phagocytose des cellules apoptotiques, la présence d'IL-10 ou d'IL-4 (84). La résolution de l'inflammation passe ainsi par l'élimination des cellules immunitaires apoptotiques, plus particulièrement, des neutrophiles par les macrophages. Ce phénomène est appelé efferocytose. Il est l'un des processus permettant le passage du M1 vers le M2 réparateur (85).

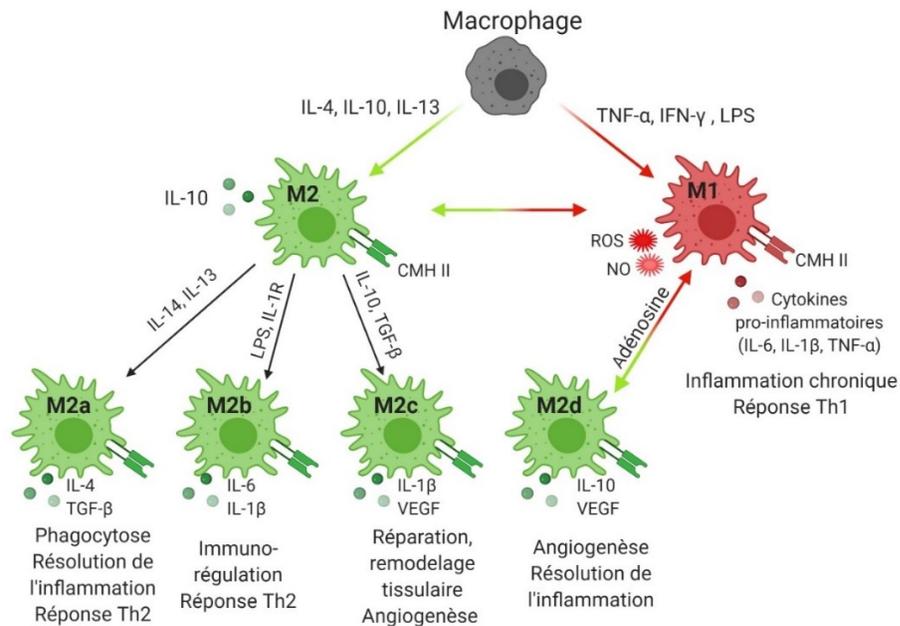
1.4.2.2. Les macrophages M2

Les M2 sont des macrophages spécialisés dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire (Fig.5). Ils sont activés par la voie alternative, par la reprogrammation des macrophages ou à la suite de la phagocytose des cellules apoptotiques (86). Ils sont caractérisés par l'expression sélective de certains marqueurs de surface comme l'arginase-1, la *chitinase-like protein* (Ym1) ou le récepteur au mannose (CD206) (87). *In vitro* et sous l'influence de l'IL-4 et de l'IL-13, les M2 fusionnent entre eux pour former de grosses cellules multinucléées (88). Globalement, ils sont capables de phagocytose, d'endocytose et d'autophagie. Ils sont répartis en quatre sous-groupes :

- Les M2a qui, par l'exposition à l'IL-4 et l'IL-13, vont entraîner l'activation alternative de la voie des *janus kinases* (JAK) et de *signal transducer and activator of transcription 6* (STAT6) permettant ainsi la diminution de la voie NFκB (89) et l'augmentation de l'expression du CMH II (90). L'activation des JAK 1 et 3 entraîne la phosphorylation de STAT6. Ce facteur de transcription entre dans le noyau et active la transcription de GATA3 (un inducteur des Th2) (89). JAK 1 peut également phosphoryler les récepteurs à l'insuline, activant la voie du phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/ serine/thréonine kinase (AKT)/ *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) impliquée dans la survie et la croissance cellulaire (91). L'IL-4 est capable d'augmenter l'expression de l'IL-10 et du *transforming growth factor beta* (TGF-β), des molécules à effet anti-inflammatoire (92).

- Les M2b sont activés par l'exposition aux LPS présents sur la membrane externe des bactéries Gram négatives, aux complexes immuns, aux antagonistes des TLR ou à l'IL-1R. Ils partagent des récepteurs en commun avec les M1 (TNF-R, IL-1R) et sont associés à des fonctions d'immunorégulation, notamment par la promotion des réponses Th2 (93). Leur fonction d'immunorégulation provient de leur capacité de produire des cytokines pro- et anti-inflammatoire ce qui oriente la balance vers un profil M1 ou M2 (94).
- Les M2c sont activés par l'exposition à l'IL-10 et le TGF- β . Ils ont un rôle dans la réparation et le remodelage tissulaire. Par la sécrétion de facteurs de croissance, ils favorisent la prolifération et la différenciation des cellules. Ils possèdent également un rôle dans l'angiogenèse par la sécrétion du VEGF et possèdent une action immunosuppressive (71).
- Les M2d sont activés par le récepteur adénosine et proviennent de la reprogrammation d'un macrophage M1 activé par la voie classique vers un phénotype anti-inflammatoire. Les M2d répriment la production des cytokines pro-inflammatoires (IL-12 et TNF- α), induisent la sécrétion de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire et la production du VEGF qui stimule l'angiogenèse (95).

Figure 5. L'activation et la polarisation des macrophages



Légende Fig.5. Schématisation de l'activation et de la polarisation des macrophages vers un sous-type pro- ou anti-inflammatoire *inspirée et modifiée avec autorisation de (96).*

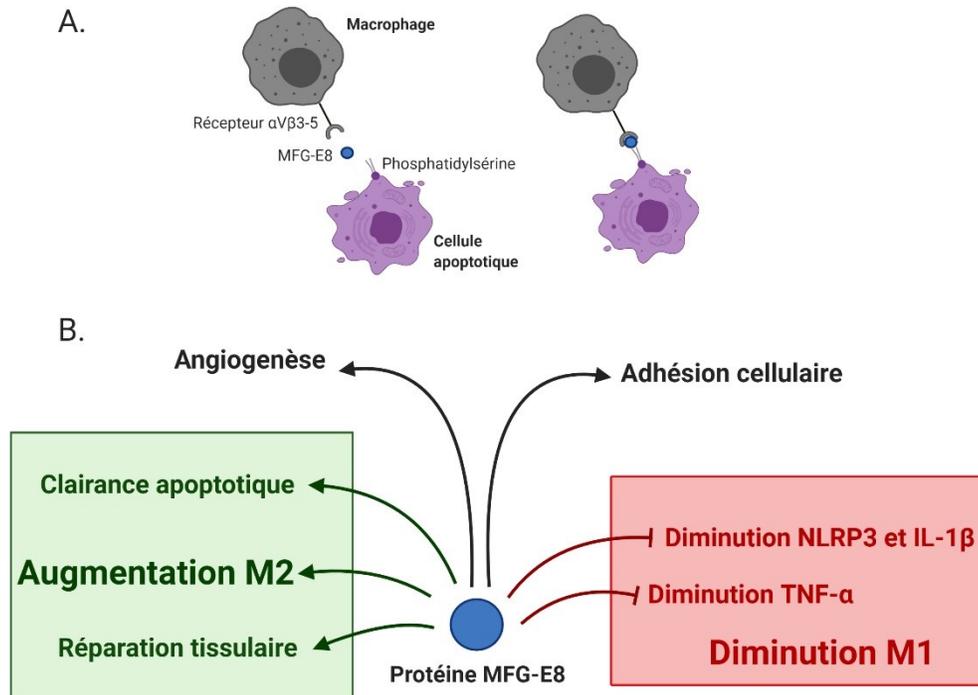
Un macrophage peut se différencier en phénotype M1 ou M2. Les M1 sont hautement inflammatoires, responsables de l'inflammation chronique et des réponses de type Th1. Les M2 sont tous des producteurs d'IL-10. Ils sont divisés en 4 sous-types : Les M2a, M2b, M2c et M2d. Ils ont chacun leurs propriétés, mais sont tous associés à un profil favorisant la réparation tissulaire et la diminution de l'inflammation.

1.4.2.3. La protéine MFG-E8

La protéine *milk fat globule-epidermal growth factor 8* (MFG-E8) aussi connue sous le nom de lactadhérine, p47, BA-46 ou SED est une glycoprotéine découverte dans le lait et les cellules mammaires épithéliales (97). Elle est connue pour être exprimée par un grand nombre de types cellulaires tels que les monocytes, les macrophages, les astrocytes, la microglie, les cellules dendritiques, les cellules épendymaires et les spermatozoïdes (98-100). Elle est associée à de nombreuses fonctions qui dépendent de sa localisation. Elle intervient dans l'adhésion cellulaire par sa capacité à se fixer aux intégrines. Comme illustré dans la Figure 6, cette liaison est permise par la présence du côté N-terminal d'un ou deux domaines EGF-like qui, par leur motif RGD (Arg-Gly-Asp), reconnaissent les intégrines de type $\alpha_v\beta_3$ ou $\alpha_v\beta_5$. Du côté C-

terminal, cette protéine possède deux domaines discoïdines qui permettent à la protéine MFG-E8 de reconnaître les phosphatidylsérines exposées sur les cellules apoptotiques (101). Elle peut donc faire le lien entre une cellule apoptotique et une cellule phagocytaire ce qui explique son implication dans la clairance apoptotique (102). La liaison entre le récepteur $\alpha_V\beta_3$ ou $\alpha_V\beta_5$ des intégrines et les phosphatidylsérines exposées entraîne un changement de conformation des récepteurs $\alpha_V\beta_{3-5}$ qui recrutent p130-CrkII-DOCK180 et activent *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1). L'activation de Rac1 permet la réorganisation du cytosquelette du macrophage résultant par la formation du phagosome (103). Une étude *in vitro* a également montré que les cellules apoptotiques augmentaient l'expression du MFG-E8 chez les macrophages, favorisant ainsi leur clairance apoptotique (104). Cette clairance apoptotique est cruciale dans la diminution de l'inflammation, car elle prévient le passage du stade d'apoptose à nécrose secondaire (105-108). La protéine MFG-E8 possède différents rôles comme des fonctions dans l'angiogenèse (109-111) et dans les réponses immunitaires (adaptatives ou innées) (112, 113) et la réparation tissulaire (114), lui donnant des propriétés anti-inflammatoires (115, 116) dont l'inhibition de l'inflammasome (116). Elle peut, en effet, inhiber la mise en place de la voie NLRP3 pour empêcher la sécrétion d'IL-1 β par les macrophages (117). Dans un modèle murin de péritonite induite par l'exposition au LPS, le traitement par la protéine MFG-E8 a été démontré comme entraînant la phosphorylation de STAT3 et l'augmentation de l'expression de *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3) responsable de la diminution de la production de TNF- α par les macrophages (118).

Figure 6. Schématisation de la double opsonisation et des rôles principaux de la protéine MFG-E8



Légende Fig.6. Résumé des fonctions principales de la protéine MFG-E8.

Fig.6A. La protéine MFG-E8 joue le rôle de pont entre un macrophage par son interaction avec le récepteur macrophagique $\alpha V\beta_{3-5}$ et la cellule apoptotique par sa liaison aux phosphatidylsérines exposées ce qui facilite la clairance apoptotique.

Fig.6B. La protéine MFG-E8 favorise les M2 par l'augmentation de la clairance apoptotique et de la réparation tissulaire. Elle diminue les M1 en inhibant la voie du NLRP3 et la sécrétion de l'IL-1 β . Cette protéine est également impliquée dans l'angiogenèse et l'adhésion cellulaire.

Une des études préliminaires réalisées dans notre laboratoire (116) montre l'importance de la protéine MFG-E8 dans le microenvironnement des macrophages et son influence sur leur reprogrammation vers un profil anti-inflammatoire M2. Ses fonctions protectrices et anti-inflammatoires ont été étudiées dans des modèles d'ischémie (117). Au niveau du système nerveux central (SNC), le manque de cette protéine entraîne l'augmentation de l'inflammation et de la mort neuronale (119). Dans un modèle d'accident vasculaire cérébral murin, son utilisation a été associée à la promotion de la prolifération et de la migration des cellules souches neuronales vers le site ischémique (101). Dans un modèle *in vitro* de neuro-inflammation, son

implication dans l'augmentation de la clairance des neurones apoptotiques et vivants par la microglie a été observée (120). De plus, cette protéine est de plus en plus étudiée dans la maladie d'Alzheimer où elle semble promouvoir la clairance des dépôts β -amyloïdes (121). La protéine MFG-E8 constitue donc un axe de recherche intéressant dans la quête de nouvelles thérapies dans le cas des pathologies cérébrales où l'inflammation et la mort neuronale sont liées à l'apparition de symptômes et qu'aucun traitement ne permet actuellement de les limiter.

1.5. Les neutrophiles

Les neutrophiles ont été découverts par Paul Ehrlich à la fin du 19^e siècle, une découverte qui lui valut l'obtention du prix Nobel (122). Les neutrophiles sont les leucocytes les plus nombreux du sang et représentent 50 à 75% des leucocytes circulants. On les appelle neutrophiles, car ils ne fixent ni les colorants basiques ni les colorants acides (ils restent neutres) (123). Ils appartiennent à la famille des leucocytes polymorphonucléaires, car ils possèdent un noyau polylobé. En cas d'inflammation, ils sont les premières cellules immunitaires à arriver sur le site inflammatoire. Dans des conditions physiologiques, leur demi-vie est courte, entre 6 et 8 heures, car ils sont entièrement consommés par leur fonction. On estime à 10^{11} le nombre de neutrophiles produits par jour (124).

Les neutrophiles appartiennent à la famille des granulocytes caractérisée par la présence de granules cytoplasmiques. Ils possèdent jusqu'à 200 granules dans leur cytoplasme (125). Ces granules peuvent être classés en quatre familles différentes (126).

Les vésicules sécrétoires sont les premières à être mobilisées en cas d'inflammation. Elles sont composées des récepteurs membranaires requis pour les phases précoces d'activation et d'adhésion à l'endothélium des neutrophiles. Ces récepteurs incluent les récepteurs au $Fc\gamma III$ (CD16), les récepteurs au LPS, les intégrines et les récepteurs aux peptides bactériens formylés (fMLP) qui seront transloqués à la membrane cellulaire lors de l'exocytose permettant l'interaction avec l'endothélium vasculaire et les autres leucocytes (124, 127-130).

Les granules primaires azurophiles ou peroxydes positifs sont les premiers formés et contiennent des hydrolases, protéases, des protéines antibactériennes telles que la myéloperoxydase, des cathepsines et des défensines qui expliquent leur spécialisation dans

l'élimination des microorganismes (131). Ces vésicules peuvent fusionner avec la voie endosomale et/ou phagosomale ou être sécrétées pendant l'exocytose.

Les granules secondaires spécifiques possèdent également une fonction antimicrobienne par la présence de lactoferrine, de lipocaline ou de pro-défensine, et contiennent le système NADPH oxydase. Ils s'orientent préférentiellement vers l'exocytose pour la sécrétion de leur contenu (132). Ils sont cruciaux pour la modulation de la migration et l'adhésion des neutrophiles.

Les granules tertiaires à gélatinase sont hautement concentrés en métalloprotéinases qui détruisent la matrice extracellulaire. Ces granules sont impliqués dans la diapédèse (traversée de l'endothélium) des neutrophiles, car ils facilitent l'extravasation et le déplacement des neutrophiles dans le milieu extracellulaire. Ces granules constituent un réservoir de récepteurs membranaires et de molécules d'adhésion cellulaire (CD11b, CD66b) utiles pour la diapédèse des neutrophiles (133).

Durant leur migration vers le site inflammatoire et en fonction des signaux inflammatoires rencontrés, les neutrophiles sont ralentis dans leur circulation. Ils s'accrochent de façon transitoire aux cellules endothéliales grâce aux interactions entre leurs L- et P-selectines ainsi que par leurs récepteurs endothéliaux respectifs. La L-selectine ou CD62L est exprimée constitutivement sur les neutrophiles à l'état basal, mais disparaît rapidement à la suite du processus de transmigration endothéliale (130, 134). Cette fixation initialement transitoire active les intégrines des neutrophiles et permet leur fixation définitive précédant ainsi la diapédèse des neutrophiles. Une fois dans le tissu, les neutrophiles migrent en fonction du gradient de chimiokines vers le site inflammatoire (10, 127, 130).

Les neutrophiles sont des phagocytes professionnels qui peuvent s'activer par la réception de signaux exogènes comme le LPS et les fMLP ou par la présence de cytokines endogènes comme le TNF- α . Chez l'homme, le phénotype activé du neutrophile est caractérisé par l'expression élevée des molécules d'adhésion cellulaire CD11b et CD66b ainsi que par la perte de l'expression du CD62L (128, 129, 134). Chez les souris, les neutrophiles sont identifiés par la présence des marqueurs CD11b et Ly6G (135). Ces neutrophiles sont capables de phagocyter des pathogènes et de les détruire dans le phagosome par le système NADPH oxydase

et la production de ROS. Dans le neutrophile, ce système converti l'O₂ en H₂O₂ qui est lui-même transformé par la myéloperoxydase en acide hypochlorique (HOCl), une molécule qui possède un fort pouvoir antimicrobien. Les neutrophiles utilisent donc le phénomène d'explosion oxydative (*respiratory burst*) par l'importante production et libération de ces ROS. Ce mécanisme très efficace pour l'élimination des microorganismes peut être potentiellement dangereux et engendrer des dommages tissulaires (124, 127, 130).

Les neutrophiles sont de plus en plus étudiés pour leur capacité de production des *neutrophil extracellular traps* (NETs) ou pièges extracellulaires appelés NETose. Il s'agit de structures en toile tissée composées de chromatine et de protéines antimicrobiennes provenant des granules neutrophiliques. Leur but est de piéger les microorganismes extracellulaires pour faciliter leur élimination (136). Ces structures neutrophiliques emprisonnent et tuent les pathogènes dans un dernier effort de sacrifice cellulaire (124, 127, 130). Ce mécanisme a initialement été décrit comme un suicide cellulaire, mais certaines études ont montré que l'ADN libéré était mitochondrial et que ce phénomène n'influçait pas la durée de vie des neutrophiles (137, 138).

L'activation excessive des neutrophiles, pouvant contribuer aux dommages collatéraux, est évitée par leur durée de vie courte et leur élimination par apoptose. La phagocytose des neutrophiles est donc essentielle à la résolution de l'inflammation et un retour à l'homéostasie cellulaire (95).

1.6. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (*dendritic cells* ou DC) ont été découvertes par Ralph Steinman en 1970, ce qui lui a valu l'obtention du prix Nobel en 2011 (139). Ces cellules sont caractérisées par des prolongements membranaires très développés assimilables à des dendrites neuronales, d'où l'origine de leur nom. Les DC sont une population cellulaire hétérogène composée de plusieurs sous-types possédant des fonctions et des capacités migratoires variables. Les DC sont trouvées dans tout le corps et représentent 2 à 4% des leucocytes (140). Leur fonction principale est de faire le lien entre le système immunitaire inné et adaptatif par la présentation des AG aux LT par leur fonction de CPA (141). Les DC sont capables de phagocytose, de macropinocytose

et d'endocytose, mais ne sont pas des phagocytes professionnels (142). En conditions normales, les DC immatures jouent un rôle de senseurs de l'environnement à la recherche d'AG étrangers. Les DC immatures possèdent des récepteurs *CC chemokine receptor 5* (CCR5) et CCR6 pour reconnaître les stimuli inflammatoires et migrer vers le site de danger. Par la phagocytose, elles s'activent, capturent et internalisent les AG étrangers. Leur activation permet leur maturation et leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires pour l'activation des LT CD4⁺ via leur CMH II (143). La migration des DC leur permet de finaliser leur maturation. Elles expriment alors les marqueurs de costimulation (CD80 et CD86) et se spécialisent dans la sécrétion de cytokines pour attirer et activer les LT CD4⁺ (144). Les DC sont également capables d'activer les LT CD8⁺ par présentation croisée des AG au niveau du CMH I favorisant l'activation des LT cytotoxiques (145).

Les DC peuvent être d'origine myéloïde (DC myéloïdes ou classiques) ou lymphoïde (DC plasmacytoïdes) (146). Les DC plasmacytoïdes sont issues de la différenciation des précurseurs dans la moelle osseuse (147). Ce sont des cellules circulantes spécialisées dans la sécrétion d'IFN de type 1 pour la lutte spécifique contre les infections virales. Elles jouent un rôle dans la différenciation des LB et le recrutement des cellules immunitaires au site infecté via la production de cytokines comme l'IL-6 et le TNF- α (148). Cependant, ces DC plasmacytoïdes ont un faible pouvoir d'activation des LT CD4⁺ du fait d'un haut taux de renouvellement du CMH II (149).

Les DC classiques sont les plus communes et sont généralement résidentes des tissus. Elles partagent des marqueurs de surface en communs avec la lignée monocytaire dont le CD11c. Elles sont riches en TLR car elles sont spécialisées dans la reconnaissance des pathogènes. Les DC classiques sont réparties en deux catégories, les DC classiques 1 et 2. Les DC classiques 1 sont spécialisées dans la présentation antigénique croisée pour l'activation des LT CD8⁺ et dans la promotion de l'activation Th1 (150, 151). Les DC classiques 2 sont composées d'un grand nombre de récepteurs en commun avec les monocytes dont les TLR et les NLR. *In vitro* ce sous-type de DC possède la capacité de promotion des Th1, Th2, Th17 et des cellules LT CD8⁺, suggérant un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires *in vivo* (152, 153).

En conditions inflammatoires, les monocytes CD14⁺ peuvent se différencier en DC. Ces DC inflammatoires expriment des marqueurs comme le CD11c, CMH II, CD206 et CD209 (154).

1.7. Les cellules natural killers

Les cellules NK sont des cellules sentinelles du système immunitaire inné. Elles ont été découvertes dans les années 1970 chez l'humain et la souris et sont définies par leur activité de cytotoxicité spontanée indépendante de l'activation par les CPA (155). Elles dérivent des progéniteurs lymphoïdes communs, ce qui explique qu'elles sont les membres fondateurs de la famille des cellules lymphoïdes innées (156). Elles sont impliquées dans l'immunorégulation par l'élimination des lymphocytes activés via la libération des perforines contenues dans leurs granules cytoplasmiques. Les cellules NK sont des cellules effectrices impliquées dans la lutte antivirale. Elles répondent rapidement aux changements micro-environnementaux tels qu'une infection, l'exposition à des cytokines pro-inflammatoires ou à des messagers de stress cellulaires ainsi qu'à la diminution de l'expression du CMH I. L'activation des cellules NK peut se produire par la présence de différentes cytokines comme l'IFN ou l'IL-2 ou bien par la perception d'un changement dans l'équilibre des signaux activateurs ou inhibiteurs des récepteurs NK par la reconnaissance des PAMPs. Les cellules NK activées sont capables d'une importante fonction cytotoxique et d'une production rapide de cytokines telles que l'IFN- γ . Les cellules NK ont un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires. En effet, par la sécrétion des cytokines, elles régulent le phénotype de nombreuses cellules immunitaires. On parle de rôle régulateur, car d'une part, elles stimulent la différenciation des Th1 mais d'autre part, elles régulent négativement les LT par la reconnaissance et l'élimination des LT activés. Leur action cytotoxique peut être médiée par la sécrétion de leurs granules cytosoliques contenant des perforines et des granzymes ou par l'induction directe de l'apoptose de la cible via les récepteurs de mort (157).

Chez l'humain, on distingue 3 sous-types de cellules NK par l'utilisation des marqueurs CD56 et CD16. Les cellules NK classiques (CD56^{dim}CD16⁺) forment la sous-population dominante des cellules NK dans le sang périphérique. Cette sous-population est considérée comme la population effectrice des cellules NK qui serait capable de produire différents types de cytokines et donc de réguler les réponses immunitaires (158). Les cellules NK modulateurs

(CD56^{bright}CD16⁻) sont considérées comme la population précurseur des cellules NK. Elles possèdent un important pouvoir de sécrétion de cytokines anti-inflammatoires suggérant une implication dans les réponses immunitaires précoces (159). De plus, dans le cas d'une étude clinique réalisée sur 22 patients atteints de sclérose en plaque, la diminution de l'inflammation cérébrale a été associée avec une expansion des cellules NK CD56^{bright}. La dernière sous-population, les cellules NK anergiques (CD56⁻CD16⁺), est considérée comme un ensemble de cellules matures avec des fonctions altérées (160). Le niveau d'expression du CD16 a été montré comme directement associé au niveau de cytotoxicité cellulaire des cellules NK (161). Cependant, les conséquences et les caractéristiques cliniques de ces trois sous-types de cellules NK restent actuellement incomprises.

1.8. Le système immunitaire adaptatif

Le système immunitaire adaptatif ou acquis permet une réponse immunitaire spécifique contre un AG. Il est caractérisé par la mise en place d'une mémoire immunitaire pour augmenter l'efficacité en cas de réexposition au pathogène. Cette réponse immunitaire adaptative est plus longue à mettre en place que la réponse innée. Elle inclut deux types de réponses dites humorale et cellulaire. Une des spécificités du système immunitaire adaptatif est l'expansion clonale des lymphocytes activés. À la fin de la réponse immunitaire, les lymphocytes issus de l'expansion clonale sont éliminés. Certains vont persister et devenir des cellules mémoires pour la prochaine rencontre avec le pathogène.

1.8.1. Les récepteurs du système immunitaire adaptatif

Les cellules du système immunitaire adaptatif sont les LT et les LB. Les récepteurs de cette réponse immunitaire sont les *B-cell receptor* (BCR) pour les LB et les *T-cell receptor* (TCR) pour les LT. Le BCR est composé de deux régions constantes, appelées fragments Fc et de deux régions variables. Ces récepteurs appartiennent à la famille des immunoglobulines. Les TCR contiennent les chaînes α et β qui sont toutes les deux composées d'une partie variable et d'une constante (162). Les régions variables de ces récepteurs constituent la zone de fixation des AG. Ces récepteurs reconnaissent spécifiquement un AG unique et activent une réponse spécifique à cet AG. Afin d'assurer la formation d'un important répertoire potentiel de

récepteurs uniques, les gènes codant pour les récepteurs BCR et TCR font l'objet d'une recombinaison spéciale somatique et aléatoire de l'ADN dite recombinaison VDJ. La combinaison unique des segments VDJ ainsi que l'addition de nucléotides de façon aléatoire pendant la recombinaison sont à l'origine de la diversité des récepteurs (3). Ces récepteurs durant leur maturation apprennent à distinguer le soi, du non-soi par les sélections positive et négative. Ces étapes permettent de sélectionner les LT qui reconnaissent uniquement les CMH du soi exposant un peptide et d'éliminer les LT qui reconnaissent avec une trop forte affinité les CMH exposant des peptides du soi pour éviter qu'ils induisent la destruction des cellules normales (163).

1.8.2. L'immunité cellulaire

L'immunité cellulaire est dépendante des LT qui s'attaquent directement à l'AG des pathogènes ou des cellules cibles. Les LT sont caractérisés par l'expression du marqueur de surface CD3 (164). Ils sont divisés en deux sous-types : les LT auxiliaires CD4⁺ ou Th et les LT cytotoxiques (LTC) CD8⁺ (165). Leur activation dans les ganglions lymphatiques est dépendante des CPA, dont tout particulièrement les DC, qui arrivent de la zone infectieuse. Les CPA entrent en contact avec les LT naïfs qui ont une forte expression du CD45RA (166) et du CD62L (167). Ces deux marqueurs permettent la ségrégation des différents sous-types de lymphocytes. Les LT naïfs sont CD45RA⁺CD62L⁺, les LT effecteurs sont CD45RA⁻CD62L⁺, les LT mémoires centraux sont CD45RA⁺CD62L⁻ et les LT effecteurs mémoires CD45RA⁻CD62L⁻. L'activation des LT permet l'expression de marqueurs d'activations tels que le CD69, le CD278 et le CD25 (168).

Les lymphocytes Th sont spécialisés dans la coordination des réponses immunitaires. Ils reconnaissent les CMH II des CPA (Fig.7). Ils se divisent en deux sous-populations caractérisées par des profils de sécrétion cytokiniques différents. Les Th1 sont impliqués dans l'immunité cellulaire par la sécrétion de l'IFN- γ et de l'IL-2 qui favorisent l'activation des LTC. Ils augmentent également l'activation des macrophages pour stimuler l'élimination des pathogènes intracellulaires. Les Th2 sécrètent l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-10. Ils sont impliqués dans la réponse humorale par l'activation des LB et donc dans la lutte contre les parasites extracellulaires. Les Th17 sont spécialisés dans la production d'IL-17 (169). Ils sont impliqués dans l'inflammation locale par le recrutement de neutrophiles. Ils sont décrits pour leurs fonctions dans la lutte contre

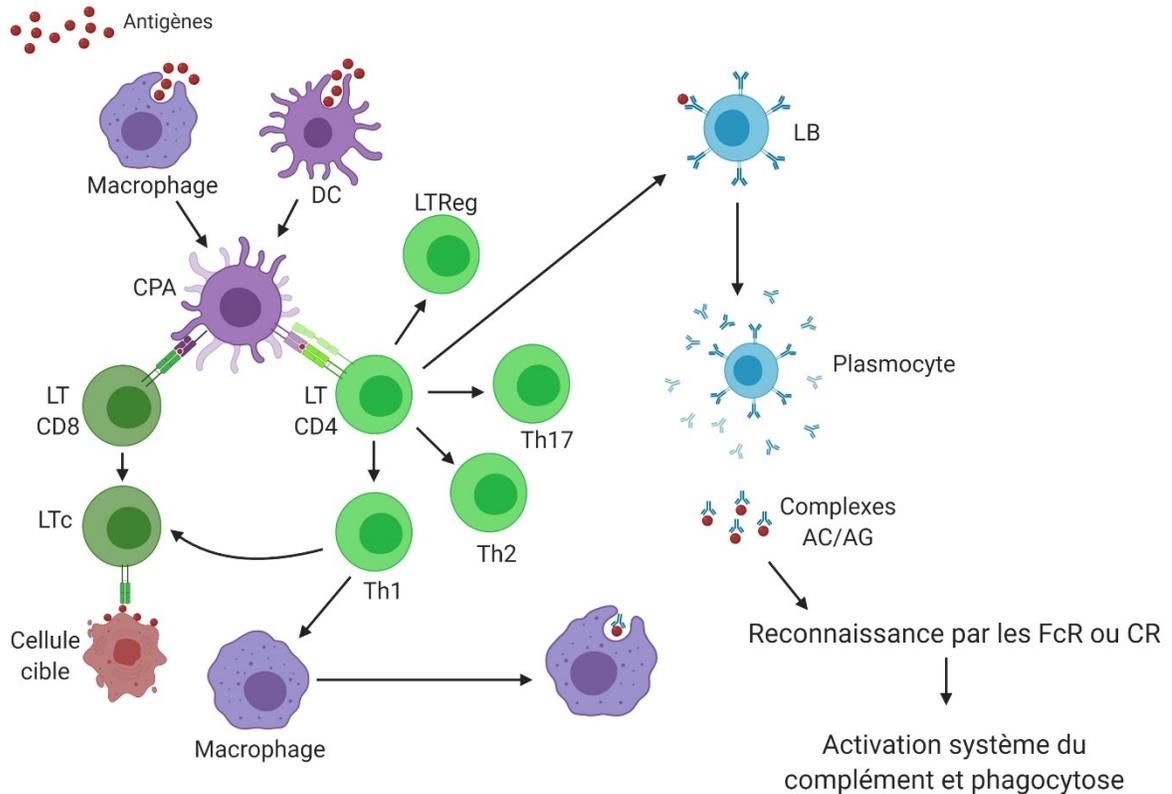
les pathogènes extracellulaires et les phénomènes auto-immuns. Il existe d'autres types de Th appelés les LT régulateurs. Ils aident à prévenir l'activation des lymphocytes auto-immuns qui détruisent les cellules du soi. Ils détiennent donc un rôle crucial dans l'homéostasie et sont identifiables par l'expression nucléaire du marqueur *forkhead box P3* (FoxP3) (170).

Les LTC sont des lymphocytes spécialisés dans la destruction des cellules infectées qui reconnaissent le CMH I à la surface des toutes les cellules nucléées (Fig.7). Les cellules infectées exposent via leur CMH I des peptides étrangers qui sont reconnus par le TCR des LTC. Le LTC induit la mort cellulaire par des mécanismes faisant intervenir la libération de perforines et de serines protéases comme les granzymes qui créent des pores dans la membrane de la cellule cible ou la reconnaissance entre FAS et FAS-Ligand pour l'induction directe de la mort cellulaire (171).

1.8.3. L'immunité humorale

L'immunité humorale est supportée par les LB qui produisent des Ac spécifiques de la particule à éliminer (Fig.7). Un anticorps est une immunoglobuline en forme de Y composée de 4 chaînes polypeptidiques (2 lourdes et 2 légères) reliées entre elles par des ponts disulfures. Les chaînes légères sont constituées d'un domaine constant et d'un domaine variable alors que les chaînes lourdes sont constituées d'un domaine variable et d'un ou plusieurs fragments constants en fonction du type d'immunoglobuline. La queue de l'Ac est appelée fragment Fc, il est constitué de la partie constante des chaînes lourdes de l'Ac qui peut être reconnu par les cellules exprimant les récepteurs aux fragments Fc et par certaines protéines du système du complément. La réponse immunitaire est dirigée contre les agents infectieux extracellulaires comme les bactéries. Le BCR est une immunoglobuline (ou Ac) intégrée dans la membrane plasmique du LB. Lorsque le LB reconnaît spécifiquement sa cellule cible par la liaison Ac/AG, il s'active et commence son expansion clonale. Les LB activés se différencient en plasmocytes dont le rôle est la sécrétion accrue d'Ac spécifiques de la cible à éliminer. Les Ac sécrétés se fixent par leurs fragments variables sur l'AG permettant l'opsonisation de la particule. Les phagocytes possèdent des récepteurs aux fragments Fc, ce qui facilite l'élimination de la cellule cible. Le fragment Fc de l'Ac peut aussi être reconnu par la protéine C1 du système du complément aboutissant à la formation du complexe d'attaque membranaire et l'élimination de la cellule cible. Les LB sont identifiables par le marqueur de surface CD19 (172, 173).

Figure 7. Le lien entre le système immunitaire inné et adaptatif



Légende Fig.7. Schématisation du lien entre l'activation du système immunitaire inné et adaptatif *inspirée et modifiée avec autorisation de (174).*

Les phagocytes (macrophages, neutrophiles ou cellules dendritiques) ingèrent la cible à éliminer par phagocytose. La digestion de la cible permet l'exposition par le CMH de peptides antigéniques. Les LT sont capables de se fixer au CMH et de s'activer. Les LT CD8⁺ reconnaissent le complexe AG/CMH I, deviennent les LTC qui éliminent la cellule cible par la lyse cytotoxique. Les LT CD4⁺ se fixent au complexe AG/CMH II, se différencient en différents types de Th en fonction du microenvironnement. Les Th1 activent les macrophages et les LTC. Les LT CD4⁺ peuvent favoriser l'activation des LB en plasmocytes. La neutralisation de la cible par la fixation des Ac permet la formation des complexes Ac/AG. Ces complexes servent de signaux de reconnaissance par les phagocytes pour faciliter l'activation de la phagocytose ou l'activation du système du complément.

2. La composante immunitaire du cerveau et l'inflammation cérébrale

2.1. L'anatomie générale du cerveau

Le cerveau est un des organes les plus importants du corps humain, et sans aucun doute le plus complexe. Il appartient au SNC qui est constitué de l'encéphale, du cervelet et de la moelle épinière. Le cerveau est situé dans la boîte crânienne et est séparé de celle-ci par un ensemble d'enveloppes ainsi que par la présence du liquide céphalorachidien (LCR). Le LCR possède plusieurs fonctions comme le nettoyage des débris du cerveau et la protection immunologique du SNC (175). Son rôle principal est la protection du cerveau contre les chocs avec les parois osseuses constituant la boîte crânienne. Il joue ainsi le rôle de coussin amortisseur par l'absorption et l'amortissement des mouvements et des chocs potentiellement dangereux pour le cerveau (176). Les enveloppes protectrices (Fig.8) entourant le cerveau sont plus communément appelées méninges. Elles sont composées de trois couches de cellules distinctes :

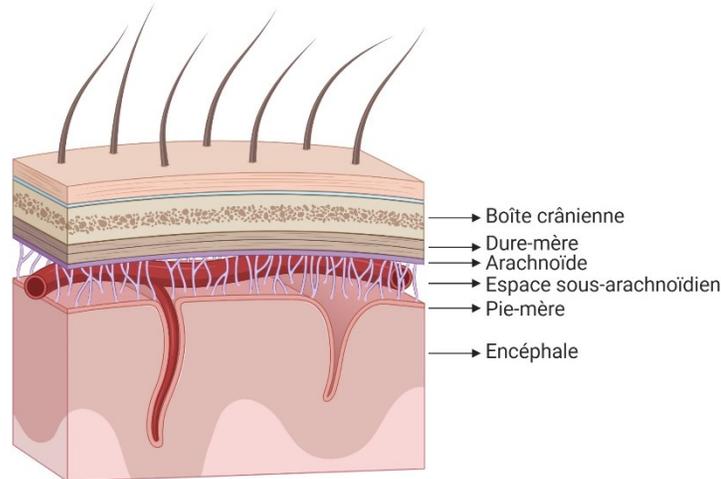
- La dure-mère, dont le nom dérive de son épaisseur et de sa solidité.
- L'arachnoïde composée de filaments très fins rappelant ceux d'une toile d'araignée.
- La pie-mère constituée d'une couche fine et délicate de cellules en contact étroit avec la surface du cerveau et qui entoure les vaisseaux sous-arachnoïdiens.

Les méninges sont considérées comme la barrière immune active du cerveau. Certains chercheurs pensent même qu'elles pourraient constituer la première ligne de défense contre les infections du SNC (177). Les méninges ne constituent pas une structure continue puisqu'il existe un espace entre l'arachnoïde et la pie-mère nommé espace sous-arachnoïdien. Cet espace communique avec les ventricules, lieu de production du LCR, par les foramens du cerveau permettant la circulation de ce dernier ainsi que la séparation entre le cerveau et les tissus osseux. Celui-ci est traversé par des vaisseaux sanguins pour faciliter la clairance des débris ainsi que les échanges métaboliques, mais en conditions physiologiques, est dépourvu de sang.

Les cellules les plus connues du cerveau et formant l'unité fonctionnelle de ce dernier sont les neurones. Ces cellules sont hautement spécialisées dans la communication intercellulaire et la signalisation électrique par la propagation d'un signal bioélectrique aussi appelé influx nerveux. Ces neurones sont communément distingués par l'immunomarquage et

l'utilisation du *neuronal nuclei* (NeuN), une protéine exprimée exclusivement dans le noyau et le cytoplasme périnucléaire des neurones (178, 179).

Figure 8. La relation anatomique entre les méninges, les vaisseaux sanguins cérébraux et le parenchyme du système nerveux central



Légende Fig.8. De l'extérieur vers l'intérieur du crâne se trouve : la boîte crânienne, la dure-mère, l'arachnoïde, l'espace sous arachnoïdien, la pie-mère et l'encéphale.

2.2. La composante immunitaire du SNC

Le cerveau diffère des autres organes par son immuno-privilege. En effet, il est séparé des systèmes sanguin et immunitaire périphériques par la présence de la barrière hémocéphalique (BHE) composée, entre autres, par les astrocytes qui sont eux-mêmes en étroite relation avec la microglie.

2.2.1. La barrière hémato-encéphalique

La BHE est le nom donné à la structure vasculaire du SNC. Elle permet une régulation fine de l'homéostasie cérébrale et favorise la fonction neuronale. Cette composante vasculaire cérébrale diffère de la composition du reste de l'organisme par la présence de cellules endothéliales spécialisées. Sa fonction première est d'isoler le SNC en limitant au maximum l'entrée des grosses molécules, des pathogènes, des toxines et des facteurs inflammatoires (180). La fonction de barrière physique est assurée par la structure particulière des cellules

endothéliales des vaisseaux sanguins qui forment une couche continue non fenestrée, connectées entre elles par des jonctions serrées (*tight junction*) (181). En plus de cette propriété physique, ces cellules endothéliales ont des capacités de transcytose et d'échanges paracellulaires très limitées, augmentant ainsi la notion de barrière imperméable de ce système (182). Le système capillaire du SNC formé de sa couche continue de cellules endothéliales interconnectées par des jonctions serrées délimite la lumière, lieu de passage du sang. Cette couche est entourée de la constante basale, une couche non continue dans laquelle sont insérés les péricytes (183). L'ensemble de ces deux couches forme l'espace périvasculaire qui contient les cellules immunitaires, dont des macrophages spécialisés et des DC qui jouent le rôle de cellules immunitaires sentinelles capables d'orchestrer une réponse inflammatoire en cas de besoin (184). Cet espace périvasculaire est entièrement entouré par les pieds astrocytaires. Les astrocytes constituent la limitante gliale, une part intégrante de la BHE qui forme une deuxième couche continue (185) augmentant ainsi l'imperméabilité de celle-ci. Les astrocytes ont pour principale fonction la régulation de l'entrée des nutriments et de l'O₂ en fonction des besoins neuronaux, ce qui assure leur fonctionnement. Certains prolongements de la microglie peuvent s'insérer au niveau de la limitante gliale et constituer la microglie juxta-vasculaire. Même si son rôle n'est pas complètement compris, elle semble impliquée dans la régulation de la perméabilité de la BHE en fonction des stimuli qu'elle perçoit (186). En condition physiologique, les jonctions serrées sont maintenues par l'expression de claudine-5 (CLD5) au niveau des cellules endothéliales. Lors de l'activation de l'inflammation, l'IFN- γ diminue l'expression de CLD5 entraînant l'augmentation de la perméabilité de la BHE au niveau de l'espace périvasculaire. Les astrocytes répondent en augmentant l'expression de CLD1 et CLD4 ainsi que certaines *junctional adhesion molecules* (JAM) pour limiter la perméabilité et l'invasion du SNC. L'augmentation de la perméabilité au niveau de la limitante gliale est considérée comme la conséquence de la sécrétion de l'IL-1 β par la microglie (187). Les métalloprotéinases (MMP) appartiennent à la famille des protéinases. Les MMP-2, -3 et -9 sont les formes majoritaires dans le cerveau. Leur activation est liée à l'hydrolyse de la matrice de la BHE et des jonctions serrées aboutissant à la déstabilisation de la perméabilité de celle-ci (188). La perméabilité de la BHE, bien que reconnue comme vitale pour l'homéostasie cérébrale, constitue donc un problème de taille dans le développement de thérapies, car elle diminue la délivrance des médicaments (189).

2.2.2. *Les astrocytes*

Les astrocytes constituent la population cellulaire la plus nombreuse du cerveau. Ils appartiennent à un ensemble de cellules de soutien du SNC appelé la glie, elle-même constituée de la microglie, des astrocytes et des oligodendrocytes. Les astrocytes, les cellules endothéliales et les neurones forment l'unité neuro-vasculaire (190). Cette unité exerce une régulation précise de l'entrée des nutriments ou d'autres éléments en fonction des besoins neuronaux. Pendant des années, cette population astrocytaire a été injustement considérée comme homogène et peu fonctionnelle, détenant uniquement un rôle de soutien de la structure du cerveau. Il est aujourd'hui acquis que les astrocytes constituent une population avec une grande hétérogénéité fonctionnelle et morphologique (191). La première description des astrocytes a été faite par Rudolf Virchow au milieu du 19^e siècle. Il a alors évoqué la présence d'un tissu conjonctif impliqué dans le maintien et l'intégrité de la structure (192). Même si leur première visualisation a été faite une dizaine d'années plus tard par Otto Deiters, il a fallu attendre 1895 pour que Michael Von Lenhossék nomme ce type cellulaire « astrocyte » en lien avec leur forme étoilée (193). Du fait de leur importante présence dans tout le SNC, cette population cellulaire détient une position privilégiée pour la régulation du grand nombre de fonctions physiologiques dont elle est la source (194). Les astrocytes sont définis comme des cellules non excitables, caractérisées par un potentiel de membrane très négatif (déterminé par le gradient de K⁺) et par la présence de filaments intermédiaires (dont la protéine *glial fibrillary acidic protein*, GFAP, est la plus connue).

2.2.2.1. *Morphologie et physiologie des astrocytes*

Les astrocytes matures sont habituellement classifiés en 3 groupes différents en fonction de leur morphologie et de leur localisation anatomique. Les astrocytes protoplasmiques sont ceux trouvés dans la substance grise. Ils ont une morphologie ronde et arborescente avec beaucoup de prolongements autour du noyau cellulaire ressemblant à une étoile, d'où leur nom. Le second groupe est appelé astrocytes fibreux du fait de leur forme moins touffue. Ils ont une capacité diminuée à former des prolongements et sont localisés dans la substance blanche. Enfin, le dernier groupe, les astrocytes allongés sont retrouvés plutôt dans des régions spécifiques du SNC. En effet, ce groupe cellulaire est composé des cellules de Müller (astrocytes localisés au niveau de la rétine) et de la glie de Bergmann (au niveau du cervelet) (195). Une des

particularités des cellules astrocytaires est que leur taille augmente avec la complexité et l'évolution des fonctions cérébrales, laissant imaginer une implication fonctionnelle indispensable aux fonctions cérébrales de ce type cellulaire.

Les astrocytes constituent une structure complète et très bien organisée étant donné la distribution systématique et sans chevauchement des prolongements de ces derniers. Ils sont liés entre eux par des jonctions serrées et sont riches en granules de glycogène. Dans la substance grise, les astrocytes protoplasmiques restent en étroite relation avec les astrocytes environnants via la présence des jonctions serrées qui permettent la transmission directe de l'information à l'aide de connexines 30 et 43 (196). Le branchage astrocytaire est très développé, c'est pourquoi on estime qu'un astrocyte est capable de contacter 100 astrocytes voisins et de recouvrir plus de 100 000 synapses (197). Cette proximité astrocytaire avec les synapses neuronales a permis l'émergence de la notion de « synapse tripartite » dans laquelle les astrocytes, du fait de leur étroite relation avec les éléments pré- et post-synaptiques, ont une position privilégiée dans la régulation de la communication au niveau de cette dernière. Du fait de la présence de prolongements (pieds) astrocytaires entourant tous les vaisseaux sanguins du SNC, les astrocytes sont considérés comme la seule porte d'entrée des éléments périphériques sanguins dans ce dernier. Ils régulent ainsi l'entrée et la sortie de molécules dans le SNC tout en constituant la BHE. Les pieds astrocytaires en relation avec la partie superficielle du parenchyme cérébral sont appelés limitante gliale et contribuent à faire du SNC un espace privilégié. Cette notion introduit l'importance des astrocytes dans la stabilité, la transmission et la plasticité synaptique (198). Cette fonction de régulation synaptique apparaît d'ailleurs, dès le développement du SNC où malgré le fait que les astrocytes sont mis en place après les neurones, ils possèdent un rôle essentiel dans la migration axonale et la mise en place des synapses (199). En effet, dans le cerveau des rongeurs, la majorité des structures excitatrices synaptiques apparaissent au cours des deuxième et troisième semaines postnatales. Cette période intense de mise en place des synapses coïncide avec la différenciation et la maturation des astrocytes (200).

Les astrocytes détiennent de nombreuses fonctions physiologiques telles que la diminution du potassium (K^+) extracellulaire au niveau synaptique en réponse à une activité neuronale (201) par la présence de canaux K^+ (202) et de pompes sodium (Na^+)/ K^+ (195). Ils jouent un rôle dans la régulation du pH par la présence de l'anhydrase carbonique, dans la

membrane des pieds astrocytaires, qui permet la transformation du CO_2 et de l' H_2O en HCO_3^- et H^+ . L'ion bicarbonate (HCO_3^-) est connu pour sa grande capacité de tamponnage de l'acide H^+ dans un milieu (203). Les astrocytes possèdent un grand nombre d'enzymes qui sont impliquées dans le bon fonctionnement des fentes synaptiques comme l'inactivation et le recyclage des neurotransmetteurs ainsi que le vidage de la fente synaptique. Prenons l'exemple du glutamate, le principal neurotransmetteur activateur du SNC, qui est inactivé par la glutamine synthétase des astrocytes. La glutamine synthétase transforme le glutamate en glutamine (inactive) qui diffuse dans le neurone pour y être recyclée en glutamate (204). Les astrocytes possèdent également plusieurs types de canaux permettant l'entrée de l'eau du compartiment vasculaire vers les astrocytes, dont l'aquaporine 4 (AQP4). Les AQP4 sont largement polarisées et retrouvées en grande quantité au niveau des pieds astrocytaires (lieu de contact avec le système sanguin). La génération de culture primaire d'astrocytes dérivant de souris *knock-out* (KO) pour l'AQP4 montre une réduction de la perméabilité de l'eau d'environ 7 fois par rapport aux astrocytes normaux (205). Ces résultats indiquent que les astrocytes constituent une voie importante d'entrée d'eau dans le SNC. Ces AQP4 sont aussi impliquées dans la facilitation du flux des différents gaz (O_2 , CO_2 et NO).

Une des fonctions essentielles des astrocytes est la protection du SNC contre le stress oxydatif. Ce dernier est particulièrement délétère pour l'environnement et est caractérisé par la sécrétion de ROS. Les cibles préférentielles de ces ROS sont les liaisons carbone-carbone insaturées des différentes membranes cellulaires qu'ils sont capables de casser. Cette cassure est responsable de la majeure partie des insultes cellulaires cérébrales rencontrées en condition pathologique. Les astrocytes contiennent de nombreuses enzymes antioxydantes capables de neutraliser ces ROS, dont le système glutathione disulfide-glutathione qui favorise la réduction des peroxydes (206), la superoxyde dismutase (SOD), une enzyme permettant l'élimination des radicaux libres, des catalases et des oxydoréductases qui sont des enzymes antioxydantes (205).

2.2.2.2. *Le rôle des astrocytes dans l'inflammation cérébrale*

Lors de l'apparition d'un déséquilibre, les astrocytes étant sensibles aux stimuli extérieurs s'activent par la modification de leur forme et de leur fonction (astrogliose). Il existe trois niveaux d'astrogliose. Le premier est appelé astrogliose réactive modérée dans lequel les astrocytes augmentent l'expression de leurs gènes, dont celui de la GFAP. Une augmentation

de la taille (hypertrophie) est aussi observable, mais celle-ci n'est pas liée à l'augmentation de la prolifération des astrocytes. Le deuxième stade est appelé astrogliose réactive sévère et diffuse. Elle est associée à l'augmentation de l'expression des gènes tels que la GFAP, à une hypertrophie et à l'augmentation de la prolifération des astrocytes. Cette réaction est associée à la modification à long terme de l'architecture tissulaire. La dernière forme est l'astrogliose réactive sévère avec l'apparition d'une cicatrice gliale compacte. Les propriétés sont les mêmes que pour le stade précédent, mais la prolifération trop importante des astrocytes cause une perte de la ségrégation des domaines astrocytaires et un recouvrement de leurs prolongements. Initialement, cette cicatrice gliale est protectrice, car elle empêche la dissémination d'une infection ou des cellules immunitaires dans le SNC. Sa mauvaise régulation peut entraîner l'apparition de dommages tissulaires (207). Il existe une dénomination fonctionnelle associée aux rôles des astrocytes dans l'inflammation. Par analogie avec la différenciation phénotypique existante chez les macrophages, on parle d'astrocytes A1 pour un état pro-inflammatoire et A2 pour un profil anti-inflammatoire (208).

Le profil A1 est activé par la microglie en cas de présence de neuro-inflammation, d'insulte cérébrale ou de maladie neuro-dégénérative (209). Il est associé à l'activation du facteur de transcription NFκB et de la transcription des gènes pro-inflammatoires (74). Les astrocytes A1 modulent l'expression des gènes des cytokines, des chimiokines, des protéines anti-apoptotiques, des molécules d'adhésions cellulaires, du GFAP, de l'iNOS et des facteurs neurotrophiques, favorisant ainsi le maintien de l'inflammation cérébrale. L'activation du NFκB est connue pour favoriser la voie de l'inflammasome dans les astrocytes augmentant la production de l'IL-1β et de l'IL-18 (79). Les astrocytes A1 ont été détectés suractivés et en surnombre dans différentes pathologies neurodégénératives. Ils y jouent un rôle dans l'augmentation de l'inflammation locale et participent à la survenue de dommages cérébraux (210-212).

Le profil A2, activé par une ischémie, est associé à un profil anti-inflammatoire (208). Les astrocytes A2 promeuvent la survie et la réparation tissulaire par l'activation de la voie STAT3, un facteur de transcription cytoplasmique. C'est un récepteur membranaire qui lors de la réception d'un signal d'activation se dimérise avec un autre STAT3. La double phosphorylation de ce dimère par la JAK autorise sa translocation dans le noyau sous forme

homodimérique et la réalisation de sa fonction de facteur de transcription (211). Les astrocytes A2 libèrent la protéine S100 qui est essentielle pour la prolifération, la réparation membranaire et l'inhibition de l'apoptose. D'ailleurs, cette protéine constitue le marqueur spécifique de ce sous-type astrocytaire anti-inflammatoire (213). Les A2 sont également connus pour sécréter le TGF- β , une cytokine anti-inflammatoire (214).

La protéine MFG-E8 est réputée pour favoriser la conversion A1 vers A2 par l'augmentation de la voie Pi3K-AKT et la diminution de la voie NF κ B (209, 215). Il est cependant important de garder en mémoire que l'orientation vers l'activation des voies pro- ou anti-inflammatoires dépend des stimuli d'activation trouvés dans le microenvironnement astrocytaire comme par exemple, le profil d'activation de la microglie ou la sécrétion de signaux de dangers par les neurones (216).

2.2.3. La microglie

2.2.3.1. Généralités et développement de la microglie

La microglie représente le groupe cellulaire le plus nombreux de la glie et environ 10% de la population cellulaire du cerveau entier (217). Le nom de ce groupe cellulaire signifie petit (micro), du fait de leur petite taille. Ces cellules ont été identifiées pour la première fois en 1919 par Del Rio Hortega. Elles sont identifiables par immunomarquage avec la protéine *ionized calcium-binding adapter molecule 1* (Iba-1), une protéine cytoplasmique spécifique de la microglie dont l'augmentation de son expression est considérée comme la preuve d'une activation de la microglie (218, 219). Le débat sur son origine a longtemps été ouvert, mais on admet aujourd'hui qu'elle dérive des précurseurs myéloïdes qui infiltrent le cerveau très tôt pendant le développement, avant même la mise en place de la BHE. En effet, la microglie est un ensemble de cellules mononuclées dérivées du mésoderme qui proviennent de la première hématopoïèse dans le sac vitellin. Cela lui donne une origine commune avec les cellules monocytaires, expliquant sûrement les nombreux points communs de fonctionnalité observés entre ces deux types cellulaires. Cette origine a été mise en évidence par une expérience de *Ginhoux et al.* Cette équipe a montré que les précurseurs de la microglie sont fabriqués au jour embryonnaire 7.5 et qu'ils utilisent le système sanguin pour gagner le cerveau en développement (220). En réalité, seule une petite partie de la population adulte microglienne infiltre le cerveau et 95% de cette population est générée après la naissance, au moment de la formation de la BHE

(221). La microglie gagne donc le cerveau avant la mise en place des astrocytes et des neurones et semble avoir un rôle dans la mise en place du SNC. Ces cellules s'accumulent autour des aires de prolifération des précurseurs neuronaux et des axones en formation pour guider leur mise en place. Elles sont à ce niveau de petite taille (forme amiboïde) et fortement mobile. Une fois que les structures neuronales et les connexions axonales sont mises en place, elles perdent leur mobilité et développent une forte densité de prolongements cytoplasmiques, aussi appelés ramifications (222).

2.2.3.2. *Le rôle physiologique de la microglie dans l'élagage synaptique*

Le rôle principal de la microglie est de protéger l'invasion du cerveau, mais elle est associée à de nombreuses autres fonctions, notamment dans la mise en place du SNC.

Durant le développement, la microglie participe à la survie, à la différenciation des lignées neuronales et à la mise en place de circuits neuronaux par la sécrétion de facteurs neurotrophiques (184). Elle est impliquée dans la structuration des synapses par l'élimination et l'ingestion de certaines structures synaptiques. Ce phénomène, appelé élagage synaptique, est indispensable à la bonne mise en place des circuits neuronaux (223). En effet pendant le développement normal du cerveau, les neurones créent des liaisons synaptiques au hasard qui ne sont pas toujours pertinentes et efficaces. Le but de la microglie est d'assurer la mise en place d'un SNC efficient et fonctionnel. Dans le développement normal du cerveau, les opsonines du système du complément peuvent faciliter la phagocytose de certains éléments des synapses immatures limitant le développement de synapses défailtantes. Chez les souris, les molécules C3a du système du complément possédant la fonction d'opsonine, sont exprimées en grande quantité au niveau des synapses immatures. Elles peuvent alors être reconnues par le CR3 exprimé par les phagocytes. Il est intéressant de noter que dans le SNC, la microglie est le seul type cellulaire possédant ce CR3. Les souris déficientes pour ce récepteur ont des déficits dans la ségrégation des yeux, traduisant la perte de cette fonction d'élagage et de mise en place de synapses fonctionnelles (223).

La fractalkine (CX3CL1), le ligand du CX3CR1, est également impliquée dans l'élagage synaptique, car les souris défailtantes pour ce récepteur ont une diminution de la force, de la connectivité et de l'excitabilité des synapses. En réponse à la sécrétion de fractalkine par les

neurones endommagés, la microglie libère la protéine MFG-E8. La protéine MFG-E8 facilite la phagocytose des neurones apoptotiques par la microglie via l'activation de la voie de signalisation du CD47, favorisant la clairance des débris inflammatoires et diminuant la mort neuronale (224).

2.2.3.3. *Le rôle physiologique de la microglie dans la mort cellulaire programmée*

La microglie appartient à la famille des phagocytes. Pendant le développement normal du SNC, les neurones surnuméraires sont éliminés par l'activation de l'apoptose. La phagocytose par la microglie des cellules apoptotiques permet de nettoyer l'environnement extracellulaire, de favoriser le développement des neurones persistants et d'éviter la nécrose secondaire hautement délétère (225). Cependant, la microglie n'a pas seulement un rôle d'éboueur dans ce processus. Elle est capable d'induire la mort cellulaire programmée des neurones. En effet, du fait de sa proximité physique avec les neurones en développement et/ou en apoptose, la microglie constitue la première ligne de régulation de leur devenir. Elle peut par un mécanisme similaire à celui du choc oxydatif observé pendant la lutte contre un pathogène, libérer des ions superoxydes, des TNF ou des facteurs de croissance nerveux provoquant l'activation de l'apoptose des cellules cibles (226). La phagocytose non inflammatoire est permise par l'activation du *triggering receptor expressed on myeloids cells 2* (TREM2), un récepteur spécifique des cellules myéloïdes appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Le TREM2 phosphoryle une protéine d'adaptation (DAP12) qui agit sur la réorganisation du cytosquelette, la promotion de la phagocytose et la limitation de la production des cytokines pro-inflammatoires. Cette protéine est essentielle pour la fonction et la plasticité synaptique, car elle favorise la phagocytose des neurones apoptotiques durant le développement (184).

2.2.3.4. *Le rôle de la microglie dans l'inflammation cérébrale*

En condition physiologique, la microglie est hautement ramifiée et possède un rôle de senseur du microenvironnement pour le maintien de l'homéostasie. En cas de perte de cette homéostasie, la microglie s'active rapidement pour répondre aux stimuli environnants et défendre le SNC. La distinction entre la microglie résidente et la microglie activée est possible par des techniques de cytométrie en flux et l'utilisation d'immunomarquage CD45 et CD11b.

La microglie résidente est caractérisée par un profil d'expression de marqueurs de surface : CD45^{low}CD11b^{low}, alors que l'ensemble des macrophages et de la microglie activée auront un profil d'expression de marqueurs de surface : CD45^{high}CD11b^{high} (227).

On parle de polarisation de la microglie, car ses réponses dépendent du microenvironnement. La microglie exprime un grand nombre de PRR à sa surface qui lui permettent de reconnaître les signaux endogènes de dommages cellulaires (DAMPs) et les signaux exogènes en cas d'infection par un pathogène (PAMPs) (16).

La reconnaissance des PAMPs par les TLR aboutit au recrutement des protéines d'adaptation nécessaires à la stimulation directe ou indirecte de la voie du NFκB (74). Parmi les protéines d'adaptation, on trouve le facteur de transcription *myeloid differentiation factor-88* (MyD88) qui par son domaine de mort cellulaire (DD) recrute des *IL-1 receptor associated kinase* (IRAK) 1 ou 4 et le *tumor necrosis factor receptor associated factor 6* (TRAF6) formant le complexe d'activation des *mitogen associated protein kinases* (MAPK) et la transcription de facteurs pro-inflammatoires tels que c-jun, NFκB et *l'interferon regulatory transcription factor 3* (IRF3) (15, 228). Les TLR 1 à 9 sont exprimés dans la microglie, mais le TLR4 y est exprimé avec une plus grande spécificité. L'expression des TLR par la microglie est augmentée lors de son activation permettant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, IL-6, IL-12, IL-18, IFN-γ, TNF-α), du NO, des ROS ainsi que de certaines chimiokines comme le *macrophage-inflammatory protein 1a* (MIP-1a) qui augmente la capacité de phagocytose et permet la mise en place d'une technique de défense agressive en cas d'intrusion du SNC (229).

Du fait de leur origine voisine avec les monocytes et les macrophages, on utilise pour la microglie la même nomenclature pour caractériser l'orientation du phénotype microglial. Ce phénotype, aussi complexe qu'il puisse être, est avant tout dépendant de la composition du microenvironnement (70). On parle donc d'activation M1-like pour l'activation pro-inflammatoire de la voie NFκB, et d'activation M2-like pour une activation anti-inflammatoire. Tout comme les macrophages, l'activation de la microglie peut être amplifiée par l'intervention des Th. Les Th1 assureront le maintien des M1-like par la sécrétion d'IFN-γ, et les Th2, le maintien des M2a-like via l'IL-4. Initialement, la littérature stipulait que les M1-like étaient activés rapidement et de façon transitoire alors que les M2-like arrivaient plus tardivement sur le lieu de l'insulte, mais pouvaient y rester activés de façon chronique. Il est maintenant acquis

que les deux sous-types sont à même d'être activés en même temps, mais qu'une des formes est majoritaire ce qui oriente la balance vers un profil pro- ou anti-inflammatoire. À l'image des macrophages, il existe un phénomène de transition entre la forme pro-inflammatoire (M1-like) et l'anti-inflammatoire (M2-like) permettant le passage d'une forme à une autre en fonction des conditions environnementales (230). Ces phénotypes peuvent être discriminés avec la méthode de marquage d'immunofluorescence par l'utilisation de marqueurs spécifiques des M1-like tels que iNOS (231) ou des M2-like tels que CD206 (218).

3. Les hémorragies sous-arachnoïdiennes

Les hémorragies sous-arachnoïdiennes (HSA) sont des pathologies cérébrales graves associées à une mortalité d'environ 35% dans les 30 jours suivant l'évènement (232). Elles constituent environ 5 à 7% de tous les accidents vasculaires cérébraux (233). Ces évènements peuvent être difficiles à diagnostiquer, car les symptômes associés sont communs à un grand nombre de pathologies cérébrales : violents maux de tête, vomissements, pertes transitoires de conscience, raideurs au niveau du cou. Heureusement, seul 1% des patients arrivant aux urgences pour un violent mal de tête ont une HSA (234). Dans 85% des cas, les HSA sont le résultat de la rupture d'un anévrisme d'une artère cérébrale (233). Les HSA d'origine anévrismales sont caractérisées par l'entrée brutale de sang dans l'espace sous-arachnoïdien. Elles peuvent être spontanées ou déclenchées par un évènement particulier comme un effort trop intense. Le bilan de ces HSA semble d'autant plus critique, en termes de nombre d'années de vie perdues sans incapacité, car les principales victimes sont des sujets jeunes âgés de 40 et 60 ans. La gravité de son pronostic fait que ses victimes nécessitent une importante prise en charge et ne retrouveront souvent pas leur qualité de vie antérieure. On estime qu'en conséquence du développement de complications d'ordre cognitives, fonctionnelles ou comportementales, seuls 1/3 des survivants vont être capables de reprendre leur travail et leur mode de vie d'avant (235). Les répercussions de cette hémorragie sont donc multiples et les mécanismes de cette pathologie restent, actuellement, imparfaitement compris. Du point de vue de la physiopathologie, l'HSA est définie par deux catégories d'évènements distincts dans le temps. Les premières sont les lésions cérébrales précoces (*early brain injury* ou EBI) en référence à tous les dommages survenant dans les premières 72 h suivant le saignement initial. Les deuxièmes sont des complications plus tardives, les ischémies cérébrales retardées (*delayed cerebral ischemia* ou DCI) qui surviennent entre 3 et 14 jours après l'HSA (236). Ces deux évènements peuvent engendrer des séquelles graves pour les patients et sont actuellement soumis à d'importantes recherches dans le but de diminuer la gravité des conséquences de ces HSA.

3.1. La pathophysiologie de l'HSA

3.1.1. Les lésions cérébrales précoces

La rupture brutale d'une artère et le déversement du sang dans l'espace sous-arachnoïdien, un espace indéformable, peuvent entraîner l'augmentation rapide de la pression intracrânienne (PIC) qui atteint alors celle de la pression diastolique, déclenchant une importante diminution du flux cérébral sanguin et de la pression de perfusion cérébrale (237). L'augmentation de la PIC cause les violents maux de tête et les pertes de conscience transitoires observés chez les patients. Cette augmentation de la PIC est associée au mauvais pronostic et aux changements métaboliques et inflammatoires constatés chez les patients HSA. La diminution de la pression de perfusion cérébrale est responsable de l'ischémie précoce appelée ischémie globale transitoire (238). Cette hypoperfusion secondaire à l'augmentation de la PIC entraîne une hypoxie locale qui augmente le facteur induit par l'hypoxie (HIF)-1 se concluant par l'augmentation de la protéine p53 et donc de la mort cellulaire rapide par apoptose (239). Les alarmines sécrétées par les cellules environnantes en cas de détection de danger activent différentes voies de signalisations telles que la voie du NFκB, responsable de l'importante inflammation locale (240). Celle-ci devra être régulée le plus rapidement possible pour éviter les dommages cérébraux via l'augmentation excessive du stress oxydatif et de l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC à la suite de la rupture de la BHE (241). Le tonus vasomoteur de cette BHE est maintenu par la présence de molécules contractiles exprimées par les cellules de l'unité neuro-vasculaire comme l'endothéline-1 (ET-1). L'expression de ces facteurs vasculo-modulateurs est dépendante de la présence du NO dans le microenvironnement. Le NO est un des « déchets » de l'activité neuronale qui est perçu par les cellules endothéliales et les astrocytes. Il constitue un signal d'augmentation de la perméabilité de la BHE en conditions physiologiques (242). En cas d'HSA, l'unité neuro-vasculaire favorise la rupture de la BHE par l'augmentation de la sécrétion de NO (depuis les neurones et les astrocytes), des chimiokines et de l'expression des molécules d'adhésions ainsi que d'ET-1 (243). Les premières cellules à arriver sur le lieu de rupture de la BHE sont les neutrophiles qui s'activent et produisent le glutamate (un neurotransmetteur exciteur du SNC). Le grand nombre de neutrophiles recrutés cause une importante libération de glutamate créant l'hyperexcitabilité neuronale. La dérégulation de l'activité neuronale est liée à l'augmentation de la sécrétion de NO qui est

perçue par les cellules endothéliales et les astrocytes comme un signal d'augmentation de la perméabilité de la BHE. Le tout formant une boucle d'amplification positive dans l'augmentation de la perméabilité de la BHE et l'installation de l'inflammation (244).

Le sang s'accumulant dans l'espace sous-arachnoïdien coagule et forme un thrombus. Ce dernier a pour fonction initiale de limiter les saignements dans l'espace sous-arachnoïdien. Cependant, dépendamment de sa taille, il peut bloquer la résorption et la circulation du LCR. Ce blocage est responsable de l'augmentation de la PIC et cause l'agglutination de facteurs (tels que les déchets du métabolisme cellulaire) potentiellement cytotoxiques pour le microenvironnement (245). La présence des globules rouges dans l'espace sous-arachnoïdien normalement dépourvu de sang entraîne leur lyse. Cette lyse libère des facteurs pro-inflammatoires, comme la protéine *High mobility group box-1* (HMGB-1), une protéine constitutive de la chromatine qui se fixe sur son récepteur, active la voie pro-inflammatoire du NFκB et engendre l'augmentation du stress oxydatif par la sécrétion de radicaux libres (246). Ces radicaux libres sont responsables de l'augmentation de la sécrétion des facteurs vasoconstricteurs (247). L'activation de la voie du NFκB stimule celle de l'inflammasome et favorise la production des cytokines inflammatoires (IL -6, IL-1β et TNF-α) (248).

L'activation de l'inflammation locale favorise également la formation d'un œdème cérébral, observé dans 8% des cas chez les patients. Ce dernier est associé à une perte cognitive et fonctionnelle aggravant le pronostic des patients (249). Des conséquences généralisées peuvent avoir lieu en réponse aux HSA comme l'apparition d'œdèmes pulmonaires neurogéniques (250), de répercussions cardiaques (251) ou l'activation d'une réponse inflammatoire systémique (252).

Globalement, les EBI sont responsables de l'activation de la mort neuronale précoce et de la mise en place d'un terrain inflammatoire élevé.

3.1.2. Les ischémies cérébrales retardées

Lorsque les patients survivent aux premiers saignements, les DCI favorisent la détérioration et l'apparition de complications fonctionnelles non prédictibles. Celles-ci sont la cause des infarctus cérébraux. Elles sont associées à une augmentation de la mortalité et de la morbidité et peuvent être transitoires ou continues (253). Les DCI semblent être la conséquence

d'un phénomène de contraction des vaisseaux sanguins, appelé vasospasme, suscitant parfois une deuxième ischémie. Le vasospasme est défini comme une contraction anormale et prolongée des muscles lisses des vaisseaux sanguins qui survient entre 3 et 14 jours après une HSA (254). La longueur dans le temps et la sévérité du vasospasme sont liées à la taille, la densité, la localisation et la persistance du thrombus dans l'espace sous-arachnoïdien (255). Le vasospasme a longtemps été considéré comme la cause principale des DCI. Malgré son étude exhaustive et sa diminution effective chez les patients lors d'essais cliniques, aucun bénéfice net n'a pu être observé. Il semblerait donc que le phénomène de DCI soit bien plus complexe que précédemment envisagé et qu'un traitement ciblé contre le vasospasme ne soit pas suffisant pour améliorer le pronostic des patients (256-261).

La présence persistante d'hémoglobine dans l'espace sous-arachnoïdien entraîne la stimulation de divers récepteurs tels que des récepteurs membranaires couplés aux protéines G et des récepteurs tyrosine kinases. L'activation des récepteurs tyrosine kinases *ras homolog family member A* (RhoA), par l'ET-1 est responsable de l'activation de la protéine G rhoA aussi impliquée dans l'inhibition de la déphosphorylation de la phosphatase de la chaîne légère de myosine augmentant ainsi la durée et l'intensité du vasospasme (262).

3.2. Les stratégies thérapeutiques essayées dans les HSA

Dans le but d'améliorer le devenir de cette population de patients en besoin, plusieurs stratégies thérapeutiques ont été développées et essayées. La plupart de ces essais visaient la réduction du vasospasme, mais n'ont pas montré de bénéfices pour les patients. L'utilisation des corticostéroïdes a montré des effets controversés dans les études cliniques (263, 264). De nombreuses études animales et cliniques se concentrant sur l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens n'ont pas été associées à une amélioration du pronostic ou de la mortalité (265-267). Les thérapies immunosuppressives (cyclosporine, tacrolimus) ou par les statines ont également donné des résultats non satisfaisants chez ces patients (268-274). Pareillement, l'utilisation d'antagonistes des récepteurs endothélines dans l'étude CONSCIOUS n'ont pas suffi à améliorer le devenir fonctionnel des patients (275).

Les différents échecs des essais cliniques et la connaissance de plus en plus approfondie de l'HSA ont orienté la population scientifique sur l'idée que les effets délétères des DCI ne sont pas spécifiques à l'apparition du vasospasme, mais constitueraient plutôt la résultante de plusieurs événements. Un point important dans cette orientation de pensée est le fait que la nimodipine, le traitement le plus efficace actuellement appartenant au protocole de prise en charge des patients HSA, ne produit aucun effet sur le vasospasme (276). Il s'agit d'un antagoniste des canaux calciques de type L-dihydropyridine. C'est aujourd'hui le seul traitement qui est associé à une amélioration significative du pronostic des patients par la diminution des DCI. Historiquement, il a été essayé sur les patients HSA pour ses fonctions vasodilatatrices et d'augmentation du flux cérébral sanguin dans le but de contrecarrer le vasospasme (277, 278). Une large étude de méta-analyse englobant 16 études cliniques et 3361 patients a cependant montré que le bénéfice apporté par ce traitement n'était nullement lié à un effet quelconque sur le vasospasme (279). Avec toutes ces explications, il semble évident que les conséquences des DCI soient multifactorielles. Finalement, de nouvelles avancées ont orienté les recherches vers d'autres causes comme les micro-embolies, la diminution de l'autorégulation de la circulation cérébrale ou les ischémies corticales. L'implication des EBI est, elle aussi, de plus en plus considérée comme constituant la base du développement et de la gravité des DCI (280). L'inflammation cérébrale a la propriété d'être considérablement augmentée à la suite d'une HSA et semble liée à une répercussion systémique. L'augmentation précoce de ces facteurs pro-inflammatoires, comme l'augmentation de la sécrétion de l'IL-6, au moment des EBI est de plus en plus considérée comme un facteur de mauvais pronostic (281). De nouvelles études ont montré qu'une diminution des neutrophiles intracérébraux était liée à la diminution du stress oxydatif, et donc, des EBI à la suite de l'induction de l'HSA chez les rats (282). De plus, les études rétrospectives avec des prélèvements sanguin sur les patients HSA tendent à montrer que les patients souffrant de DCI développaient un pic inflammatoire systémique (leucocytose, activation des neutrophiles et augmentation de la sécrétion de VEGF) supérieur entre les 24 et 48h premières heures suivant l'hémorragie (283).

4. Hypothèse et objectifs de ce projet de recherche

Basés sur ces connaissances et sur le fait qu'il n'existe actuellement aucun traitement avéré efficace pour cette population de patients, nous pensons que d'autres événements survenant dans la phase précoce après l'hémorragie jouent un rôle dans les DCI. Parmi ces facteurs, l'inflammation est probablement cruciale dans les EBI et semble fortement impliquée dans les DCI puisque plusieurs marqueurs inflammatoires ont été associés à une évolution clinique défavorable chez les patients HSA (284).

Notre hypothèse est que l'activation précoce du système immunitaire à la suite de l'HSA est responsable de la mort neuronale retardée et de la survenue des déficits constatés chez les patients souffrant d'HSA.

Notre objectif général est de développer un projet de recherche translationnelle afin de moduler les variations inflammatoires observées en réponse aux HSA et d'améliorer le devenir de ces patients.

Nos objectifs spécifiques sont :

- 1) Définir l'implication des leucocytes dans la mort neuronale secondaire aux HSA.
- 2) Comprendre les mécanismes cellulaires menant à l'activation de l'inflammation dans le contexte de l'HSA.
- 3) Identifier des cibles qui pourront être manipulées pharmacologiquement pour réduire les déficits neurologiques secondaires à l'HSA.

Afin de minimiser les biais importants provenant des différences entre les modèles précliniques et les conditions réelles en clinique, nous avons procédé à l'évaluation prospective de l'activation du système immunitaire chez les patients HSA et mis en évidence une signature immunologique cliniquement pertinente qui expliquerait la mort des cellules neuronales. Une fois cette signature établie, nous avons perfectionné notre modèle d'HSA murin reproduisant une signature similaire à celle retrouvée chez les patients. Les souris de génotype sauvage nous ont servis pour l'étude du recrutement leucocytaire intracérébral et l'évaluation du phénotype des leucocytes du sang périphérique à la suite d'une HSA. Le but était de mieux comprendre l'aspect inflammatoire systémique et de l'insulte cérébrale précoce locale. Pour la suite de ce

projet, nous nous sommes concentrés sur les mécanismes responsables de cette inflammation et nous avons testé la protéine MFG-E8 pour étudier son rôle dans la réduction des déficits neurologiques dans notre modèle murin d'HSA. De plus, afin de mieux comprendre les interactions entre les leucocytes, les neurones et la microglie, nous avons développé des modèles *ex vivo* dans lesquels des lignées cellulaires étaient incubées avec des échantillons de sérum ou de LCR provenant des patients HSA. Nous avons caractérisé leur effet sur la capacité de phagocytose et l'induction de la production de ROS, caractéristique des phénotypes pro- et anti-inflammatoires de la microglie. Les prélèvements de sang et de LCR à différents temps nous ont permis de déterminer la séquence et le type d'activation leucocytaire dans les HSA et de comparer celle-ci avec notre modèle animal.

Méthodologies

1. Le modèle animal

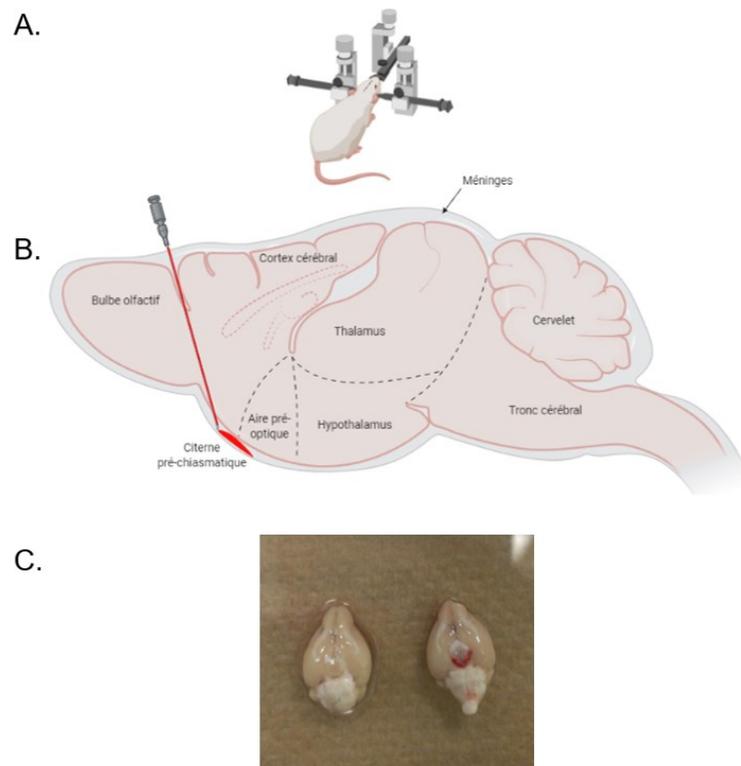
Le modèle animal utilisé est un modèle murin. Dans cette étude, nous avons sélectionné les souris C57BL/6J *Wild-Type* (WT) de sexe masculin et d'âge compris entre 10 et 12 semaines. Les souris étaient maintenues dans un cycle circadien jour/nuit de 12h, l'eau et la nourriture étant accessibles *ad libitum*. Toutes les manipulations animales ont été approuvées par le comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) du Centre de recherche du centre hospitalier universitaire de Montréal (CRCHUM) et respectaient les bonnes pratiques d'utilisation et de manipulation des animaux imposées par le service d'animalerie du CRCHUM.

1.1. L'induction de l'HSA

Le jour précédent l'induction de l'HSA, les souris étaient placées sous traitement analgésique (Acétaminophène, 160 mg/125 mL d'H₂O) et les instruments de chirurgie étaient stérilisés par autoclavage. Le jour des chirurgies, les animaux étaient manipulés sous anesthésie générale, induite par l'isoflurane (2%). Deux analgésiques étaient administrés par voie sous-cutanée quelques minutes avant la chirurgie. Le premier, la Buprénorphine, était injectée au niveau du dos à une concentration de 0,05 mg/kg en fonction du poids de la souris. Pour le second, la Bupivacaïne, 100 µL étaient injectés au niveau du crâne à une concentration 0,25%. Après l'induction de l'anesthésie générale, les souris étaient préparées pour la chirurgie et leurs têtes installées et fixées sur un cadre stéréotaxique (Stoelting, Woo Dale, IL, USA). Les souris étaient rasées au niveau du haut du crâne sur une zone partant du dessus des yeux jusqu'au cou de l'animal. Cette zone était désinfectée via l'application topique d'antiseptique, la Chlorhexidine. Une goutte de lubrifiant était appliquée sur chaque œil de l'animal pour diminuer la sécheresse oculaire secondaire à l'anesthésie. Une incision de 2 cm était réalisée à l'aide d'un scalpel sur la partie rasée et désinfectée. Un trou était percé avec un foret « micro-drill » de 0,8 mm de diamètre (CircuitMedic, Haverhill, MA, USA) à 2 mm antérieurement au bregma à un angle de 40° maintenu par le cadre stéréotaxique. L'HSA (n=60) était déclenchée par l'injection au niveau de la citerne chiasmatisque de 100 µL de sang artériel, à l'aide d'une aiguille épidurale 27 G (Braun medical, Bethlehem, PA, USA). Le sang injecté provenait d'une souris donneuse de la même espèce par prélèvement intracardiaque. La position et l'orientation de l'aiguille permettant l'induction de l'HSA sont représentées sur la Figure 9. Le sang était injecté

doucement pour limiter l'effet délétère de l'augmentation subite de la PIC. Le groupe contrôle (SHAM, n=59) a reçu la chirurgie complète sans injection de sang. L'aiguille était donc insérée et retirée sous les mêmes coordonnées stéréotaxiques. L'incision était refermée avec des points de suture et les souris placées dans un incubateur chauffé le temps de leur réveil. Le schéma expérimental est présenté dans la Figure 10.

Figure 9. Représentation schématique du principe de chirurgie



Légende Fig.9. Schématisation du principe et du résultat de la chirurgie des souris *inspirée et modifiée avec autorisation de (285).*

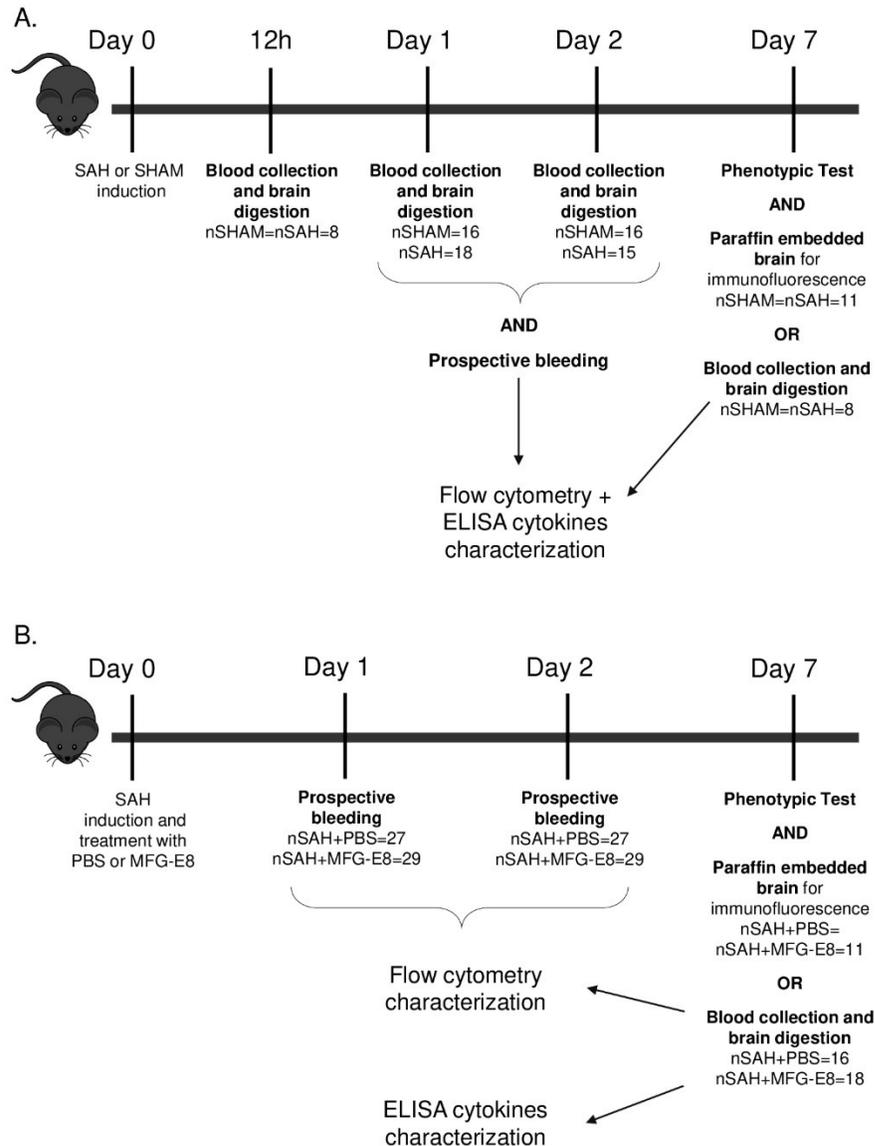
Fig.9A. Représentation schématique de l'installation des souris sur le cadre stéréotaxique et du lieu de l'incision.

Fig.9B. Représentation schématique du principe de chirurgie et de l'injection de 100 μ L de sang dans la citerne chiasmatique des souris.

Fig.9C. Photographie comparant le cerveau d'une souris SHAM (gauche) et HSA (droite) 24h après la chirurgie.

Dans une autre partie de nos expériences, les souris WT HSA C57BL/6J sont utilisées pour tester l'impact du traitement par la protéine murine recombinante MFG-E8 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA). Les méthodes d'induction de l'HSA sont les mêmes que celles déjà décrites. Les traitements au MFG-E8 (n=34) ou au véhicule, le *phosphate buffered saline* 1x (PBS 1x, n=31) étaient réalisés au moment de l'induction de l'HSA et 24h après par injection intrapéritonéale (IP). La protéine MFG-E8 était administrée à une concentration de 30 µg/kg dans son véhicule, le PBS. Le schéma expérimental est présenté dans la Figure 10. Le choix de la dose administrée provient d'une étude dose-effet qui a été utilisée dans deux études déjà publiées par notre laboratoire (286, 287). Dans une étude préliminaire, nous avons testé l'injection de plusieurs doses chez les souris HSA : une injection au moment de l'injection, deux injections (au moment de la chirurgie et 24h) et trois injections (au moment de l'induction de l'HSA, 24h et 48h). Nous avons remarqué que l'utilisation d'une dose unique n'entraînait pas assez de bénéfices pour les souris HSA et l'utilisation de 3 doses consécutives était associée à des effets délétères chez les souris HSA. Nous avons donc choisi la méthode qui était le mieux toléré par les souris, c'est-à-dire deux doses au moment de la chirurgie et 24h après.

Figure 10. Schéma expérimental des souris HSA



Légende Fig.10. Schéma expérimental des différentes manipulations des souris HSA de ce projet *inspirée et modifiée avec autorisation de (288).*

Fig.10A. Expériences sur le modèle murin HSA. L'HSA est induite à J0. À 12h (nSHAM=nHSA=8), les souris sont sacrifiées, le sang et les cerveaux sont récupérés et préparés pour les analyses de cytométrie en flux. À 24h, des prélèvements prospectifs dans la veine saphène sont réalisés (nSHAM=35, nHSA=34) ou les souris sont sacrifiées, le sang et les cerveaux sont collectés et préparés pour les analyses de cytométrie en flux (nSHAM=16, nHSA=18). À 48h, des prélèvements prospectifs dans la veine saphène sont réalisés (nSHAM=nHSA=19) ou les souris sont sacrifiées, le sang et les

cerveaux sont collectés et préparés pour les analyses de cytométrie en flux (nSHAM=16, nHSA=15). À 7j, les tests phénotypiques sont réalisés (nSHAM=nHSA=19), les souris sont sacrifiées, le sang et les cerveaux sont collectés et préparés pour les analyses de cytométrie en flux (nSHAM=nHSA=8) ou les cerveaux sont inclus en paraffine pour la réalisation de marquage d'immunofluorescence (nSHAM=nHSA=11). Le plasma des prélèvements terminaux est conservé pour le dosage des cytokines par la technique d'ELISA.

Fig.10B. Expériences sur le modèle murin HSA traité au MFG-E8. L'HSA est induite à J0 et les souris sont traitées au MFG-E8 ou au PBS au moment de la chirurgie. À 24h, les souris reçoivent la deuxième injection de MFG-E8 ou de PBS et les prélèvements prospectifs dans la veine saphène sont réalisés (nHSA+PBS=27, nHSA+MFG-E8=29). À 49h, les prélèvements prospectifs dans la veine saphène sont réalisés (nHSA+PBS=27, nHSA+MFG-E8=29). À 7j, les tests phénotypiques sont réalisés (nHSA+PBS=27, nHSA+MFG-E8=29) et les souris sont sacrifiées. Le sang et les cerveaux sont collectés et préparés pour les analyses de cytométrie en flux (nHSA+PBS=16, nHSA+MFG-E8=18) ou les cerveaux sont inclus en paraffine pour la réalisation des marquages d'immunofluorescence (nHSA+PBS=nHSA+MFG-E8=11). Le plasma des prélèvements terminaux est conservé pour le dosage des cytokines par la technique d'ELISA.

1.2. La réalisation des tests phénotypiques

Afin de vérifier l'efficacité de l'induction de l'HSA ou la diminution des symptômes à la suite du traitement par la protéine MFG-E8, deux tests phénotypiques étaient réalisés 7 jours après l'induction de l'HSA chez les souris.

Le premier test utilisé, le *holding time test*, est une adaptation de l'*inverted grid test* (289). Les souris étaient placées sur un coton-tige (Fisher scientific, Hampton, NH, USA) relié à un socle avec un angle de 30° (Fig.19). Le temps en secondes durant lequel les souris étaient capables de rester accrochées à celui-ci a été mesuré à l'aide d'un chronomètre. Le test était répété trois fois pour chaque sujet et la moyenne du temps d'accroche était calculée par souris.

Le second test utilisé était le *footprint test* (290). Les pattes avant et arrière de chaque souris étaient peintes de couleurs différentes avec de la peinture non toxique. Les souris étaient autorisées à se déplacer librement sur une feuille de papier blanche permettant la visualisation du positionnement des pattes pendant la préhension. Ce test est basé sur la capacité naturelle des souris durant leur déplacement, à poser leurs pattes arrière au même niveau qu'elles ont posé leurs pattes avant (Fig.19). Un système de score était utilisé pour évaluer cette capacité de

préhension. Un score de 0 était donné si les souris étaient capables de poser leurs pattes avant au même niveau que leurs pattes arrière. Un score de -1 était donné si les souris avaient l'une de leurs pattes arrière plus basses que leurs pattes avant, traduisant la présence d'une déficience motrice. Trois mesures par côté (droit ou gauche) étaient prises et la moyenne par souris était calculée pour la quantification.

1.3. Les prélèvements sanguins dans la veine saphène

Pour le groupe de souris 48h et J7, des prélèvements prospectifs à 24h et/ou 48h étaient réalisés par prélèvement sanguin dans la veine saphène. Les souris étaient placées dans un tube de contention. Une des jambes était isolée et rasée afin de mieux voir la veine saphène. La vaseline était appliquée dans le but de faire ressortir au maximum la veine et augmenter sa visibilité. Un trou était percé dans la veine avec une aiguille 25 G (BD Precision, Stoneham, MA, USA) et 30 μ L de sang étaient collectés dans un tube capillaire microvrette contenant de l'acide ethylenediaminetetraacetic (EDTA, Sarstedt AG&Co, Nümbrecht, Germany) et conservés dans la glace jusqu'à leur utilisation.

1.4. Le sacrifice des souris

Les souris étaient sacrifiées à 12h, 24h, 48h ou 7j dépendamment de leur groupe attribué aléatoirement. Une ponction intracardiaque terminale était réalisée sur les souris placées sous anesthésie générale induite par l'isoflurane (2%). Le sang récupéré était conservé dans un tube contenant de l'EDTA (1,3 mL, Fisher scientific, Hampton, NH, USA) et maintenu dans la glace en attendant son utilisation future. Le cœur était isolé et une incision dans le ventricule droit était réalisée à l'aide d'un ciseau chirurgical. Les vaisseaux sanguins du corps entier étaient lavés par l'injection directe de 25 mL de solution saline (0,9% NaCl) dans le ventricule gauche du cœur. L'incision faite préalablement permettait de créer un système ouvert facilitant le nettoyage des vaisseaux. Si le cerveau était prédestiné à une inclusion en paraffine, une injection intracardiaque supplémentaire de 25 mL de formaline (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) était effectuée. Sinon, le cerveau était isolé, récupéré et préparé pour les analyses cytométrie en flux.

2. La cytométrie en flux

2.1. Les principes généraux de la cytométrie en flux

Ce procédé permet d'analyser individuellement les cellules et facilite leur caractérisation qualitative et quantitative. Le passage des cellules dans le cytomètre en flux est précédé d'une étape de marquage avec des molécules spécifiques d'antigènes qui sont couplés à des fluorochromes permettant l'émission d'une fluorescence après leur excitation par un laser. Les signaux de diffusion et de fluorescence (photons) sont captés par des détecteurs qui les transforment en signaux électriques, traités par un système informatique. Chaque cellule est ainsi transformée en un « événement électrique » avec plusieurs coordonnées interprétables, dont la taille et la granularité. Ces événements électriques forment des nuages de points (sur des cytogrammes) autour desquels on trace des fenêtres électroniques (*gating*). Les données de cytométrie en flux sont traitées avec le programme Flowjo et les stratégies de *gating* sont basées sur la littérature (227, 291). Les cellules étaient passées au cytomètre LSR Fortessa (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Cet appareil a été utilisé pour toutes les expériences de cytométrie en flux de ce projet. Les données ont été collectées avec le logiciel BD *Fluorescence-activated cell-sorting* (FACS) Diva (BD Bioscience, Mississauga, Ontario, Canada). Les analyses ont été réalisées avec le logiciel Flowjo (v.10.2, flowjo, LLC). L'utilisation de ces logiciels est commune à toutes les expériences de cytométrie en flux de ce projet.

2.2. La préparation des cellules du sang de souris

Le sang collecté par prélèvements dans la saphène ou par ponctions intracardiaques terminales était centrifugé pendant 15 min à une vitesse de 4000 rotations par minutes (rpm) à 4°C. Le surnageant, résultant de cette centrifugation, composé du plasma était récupéré et stocké à -80°C. Le culot était resolubilisé dans 5 mL de tampon de lyse : Ammonium Chloride Potassium buffer (ACK: 1.5 M NH₄Cl, 100 mM KHCO₃ et 100 mM EDTA), incubé 5 min sous agitation et centrifugé (5 min, 1600 rpm, 4°C). Cette étape était répétée une deuxième fois pour éliminer complètement les érythrocytes lysés. Les culots cellulaires étaient transférés dans des tubes de cytométrie en flux, lavés avec du FACS buffer : PBS 1x, 2% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 5 mM EDTA, centrifugés (5 min, 1500 rpm, 4°C) et conservés jusqu'aux étapes communes de marquage.

2.3. La préparation des cellules du cerveau de souris

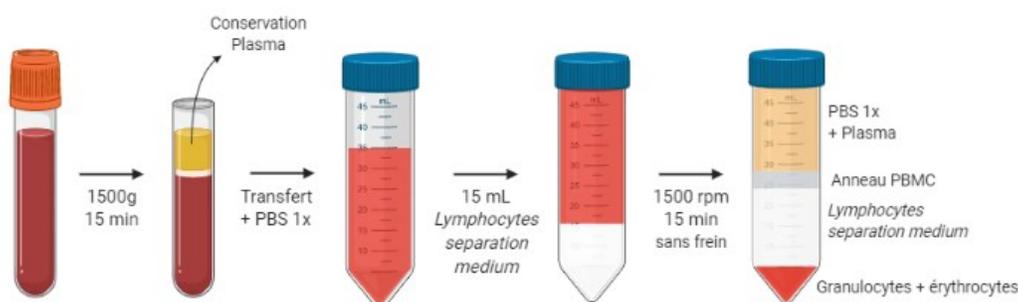
Au jour terminal des expérimentations (12h, 24h, 48h ou 7j après l'induction de l'HSA), les cerveaux étaient prélevés et conservés, sur glace, dans du milieu de culture *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI, Multicell, Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada). Les cerveaux étaient coupés en morceaux puis digérés dans un tampon de digestion [2 mg/mL de collagénase D (Roche, Diagnostics, Mannheim, Germany) et 14 µg/mL de DNase (Roche, Diagnostics, Mannheim, Germany) dans du *Hank's Balanced Salt Solution* 1x (HBSS, Gibco, Hampton, NH, USA), pendant 15 min à 37°C. Un broyage terminal était réalisé à l'aide d'un piston et d'un tamis cellulaire de 80 mesh (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) dans 10 mL d'HBSS 1x. Le filtrat était centrifugé pendant 7 min, 1400 rpm, 4°C. Dans le but d'éliminer la myéline, le culot était resuspendu dans 10 mL de Percoll® (GE Healthcare Bio-science, Uppsala, Sweden) dilué à 37% dans de l'HBSS 1x et centrifugé 10 min, 500 g sans frein, 4°C. Le Percoll® permet de séparer les différents types cellulaires par ultracentrifugation en gradient de densité. Le culot obtenu était resuspendu dans de 15 mL d'HBSS 1x et centrifugé (10 min, 1600 rpm, 4°C). À ce moment, les culots étaient prêts pour les étapes communes de marquage de cytométrie en flux.

2.4. La préparation des cellules de sang de prélèvements humain

À la suite du prélèvement sanguin sur les patients HSA, le sang collecté était centrifugé 15 min, 1500 g à température ambiante. Le plasma, contenu dans le surnageant, était récupéré et conservé à -80°C en attendant son utilisation future. Le culot était transféré dans un tube 50 mL et dilué dans du PBS 1x jusqu'à environ 35 mL. Le tout était mélangé délicatement par retournements successifs du tube et 15 mL de *Lymphocyte separation medium* (Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada) étaient ajoutés lentement et avec précautions en dessous des 35 mL du mélange de sang et du PBS 1x. L'ensemble était centrifugé pendant 30 min, 1500 rpm, sans frein à température ambiante. Le *Lymphocyte separation medium* permet de créer un gradient de séparation comme représenté dans la Figure 11. L'anneau blanc composé des cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) était récupéré et lavé trois fois par l'ajout de 50 mL de PBS 1x et une centrifugation (10 min, 1500 rpm à température ambiante). Les PBMC étaient finalement comptés, resuspendus et congelés dans du milieu de congélation : FBS + 10% de Dimethyl sulfoxide (DMSO, Bioshop, Burlington, ON, Canada) à une concentration de 11×10^6 cellules/mL. Le jour du marquage pour la cytométrie en flux, les cellules étaient

décongelées, lavées avec du PBS 1x et divisées dans les tubes de cytométrie en flux à une concentration de 1×10^6 cellules/mL dans le FACS buffer humain : PBS 1x, 0,5% d'albumine de sérum bovin (Multicell, Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada), 0,1% d'azoture de sodium (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA).

Figure 11. Isolement des PBMC



Légende Fig.11. Schéma de la méthode d'isolation des PBMC du sang de patients.

2.5. Les étapes communes du marquage de cytométrie en flux

Une fois les différents types cellulaires préparés, les étapes de marquage des cellules pour la cytométrie en flux pouvaient être effectuées. Les étapes suivantes sont communes à toutes les préparations cellulaires destinées à des analyses de cytométrie en flux. Les différents culots étaient resuspendus dans 500 μ L de FACS buffer et centrifugés 5 min, 1500 rpm, 4°C (cette étape est appelée le lavage). Dans le cas des cellules d'origine murine, les cellules contenues dans le culot étaient resuspendues dans 100 μ L de solution de blocage (CD16/CD32 : FC Block, BD Pharmingen, San Jose, CA, USA) diluée au 1/100 dans le FACS buffer, incubées 15 min puis lavées par l'étape de lavage. Les cellules d'origine humaine étaient bloquées dans 50 μ L d'immunoglobulines (Fc block, BD Pharmingen, San Jose, Ca, USA) diluées au 1/50 dans du FACS buffer humain pendant 10 min et les Ac ajoutés directement dans le tube. 100 μ L des différents mélanges d'Ac dilués (Tableaux I-VII) dans du FACS buffer étaient ajoutés aux cellules et incubés 30 min à 4°C dans l'obscurité. Certains Ac ciblant des molécules intracellulaires nécessitaient des étapes supplémentaires dans le protocole de marquage. Lorsqu'un marquage intracellulaire était nécessaire, pour donner suite au marquage extracellulaire, les cellules étaient incubées 30 min à température ambiante dans l'obscurité avec une solution de perméabilisation commerciale provenant d'un kit de perméabilisation *Fix/Perm FoxP3 buffer kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) afin de perméabiliser les membranes

extracellulaires. Un lavage dans du tampon de perméabilisation permettant le maintien de la perméabilisation était ensuite effectué. Les cellules étaient incubées 30 min à l'obscurité, à température pièce, avec les Ac intracellulaires puis lavées dans le tampon de perméabilisation. Les cellules étaient alors prêtes pour la lecture et le passage au cytomètre en flux.

Les Ac utilisés proviennent de différentes compagnies : eBioscience, BD Biosciences.

<i>Anticorps</i>	<i>Fluorochrome</i>	<i>Volume pour 1 réaction</i>
<i>CD3</i>	BV650	0,2 µL
<i>CD4</i>	BUV395	0,1 µL
<i>CD8</i>	APC-H7	0,5 µL
<i>CD11b</i>	Alexa Fluor 700	0,25 µL
<i>CD44</i>	BV786	0,5 µL
<i>CD45</i>	PE-Cy7	0,1 µL
<i>CD62L</i>	APC	0,5 µL
<i>CD279</i>	PECF594	0,5 µL
<i>Ly6C</i>	BV711	0,2 µL
<i>Ly6G</i>	APC-Cy7	0,2 µL
<i>CD278</i>	PE	0,5 µL
<i>Live/dead</i>		0,5 µL

Tableau 1. Liste des Ac utilisés sur les cellules murines.

<i>Anticorps</i>	<i>Fluorochrome</i>	<i>Volume pour 1 réaction</i>
<i>CD3</i>	AF700	0,42 µL
<i>CD4</i>	V450	0,83 µL
<i>CD8</i>	APC-H7	0,83 µL
<i>CD25</i>	APC	3,33 µL
<i>CD69</i>	PerCP.Cy5.5	1,7 µL
<i>CD62L</i>	PECF594	0,42 µL
<i>CD45RA</i>	FITC	3,33 µL
<i>CCR7</i>	PECy7	0,83 µL
<i>CD278</i>	PE	13,3 µL
<i>Live/dead</i>		0,5 µL

Tableau 2. Liste d'anticorps du panel humain « LT ».

<i>Anticorps</i>	<i>Fluorochrome</i>	<i>Volume pour 1 réaction</i>
<i>CD3</i>	AF700	0,42 µL
<i>CD4</i>	FITC	2,5 µL
<i>CD8</i>	APC-H7	0,83 µL
<i>CD25</i>	PerCP.Cy5.5	0,63 µL
<i>CD279</i>	PE	6,70 µL
<i>CD127</i>	PECF594	2,00 µL
<i>FoxP3</i>	V450	2,00 µL
<i>CD152</i>	APC	10 µL
<i>Live/dead</i>		0,5 µL

Tableau 3. Liste d'anticorps du panel humain « LT régulateurs ».

<i>Anticorps</i>	<i>Fluorochrome</i>	<i>Volume pour 1 réaction</i>
<i>CD3</i>	AF700	0,42 µL
<i>CD4</i>	V450	0,83 µL
<i>CD8</i>	APC-H7	0,83 µL
<i>Granzyme</i>	FITC	13,3 µL
<i>IL-4</i>	APC	3,33 µL
<i>IL-17A</i>	PE	6,66 µL
<i>IFN-γ</i>	FITC	3,33 µL
<i>CCR7</i>	PECF5947	0,42 µL
<i>Live/dead</i>		0,5 µL

B

Tableau 4. Liste d'anticorps du panel humain « Sécrétion des LT ».

<i>Anticorps</i>	<i>Fluorochrome</i>	<i>Volume pour 1 réaction</i>
<i>CD3</i>	AF700	0,42 µL
<i>HLA-DR</i>	PECy7	0,42 µL
<i>CD19</i>	PE	3,33 µL
<i>CD56</i>	FITC	0,42 µL
<i>CD11b</i>	APC-Cy75	0,31 µL
<i>CD16</i>	PECF594	0,10 µL
<i>CD11c</i>	V450	0,10 µL
<i>CD14</i>	PerCP Cy5.5	0,42 µL
<i>CD33</i>	APC	0,42 µL
<i>Live/dead</i>		0,5 µL

Tableau 5. Liste d'anticorps du panel humain « Leucocytes ».

<i>Anticorps</i>	<i>Fluorochrome</i>	<i>Volume pour 1 réaction</i>
<i>CD86</i>	AF700	0,13 µL
<i>CD11c</i>	V450	0,10 µL
<i>CD80</i>	APC-H7	2,00 µL
<i>CD14</i>	PerCP Cy5.5	0,42 µL
<i>CD16</i>	PECF594	0,10 µL
<i>CD206</i>	FITC	6,66 µL
<i>CD274c</i>	PECy7	0,83 µL
<i>CD23</i>	APC	1,67 µL
<i>CD66b</i>	PE	0,83 µL
<i>Live/dead</i>		0,5 µL

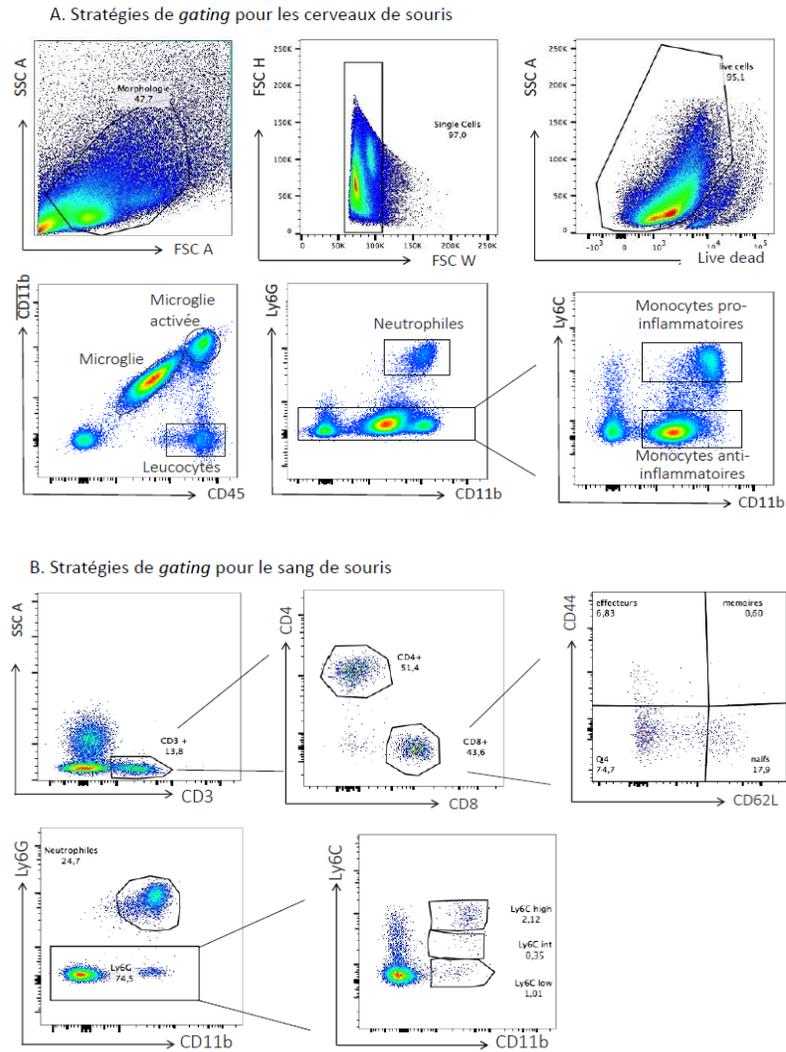
Tableau 6. Liste d'anticorps panel humain « Monocytes ».

<i>Anticorps</i>	<i>Fluorochrome</i>	<i>Volume pour 1 réaction</i>
<i>CD3</i>	FITC	3,33 μ L
<i>CD14</i>	FITC	1,67 μ L
<i>CD56</i>	FITC	0,42 μ L
<i>CD38</i>	PE	6,66 μ L
<i>CD43</i>	APC	3,33 μ L
<i>CD11b</i>	V450	0,42 μ L
<i>IgD</i>	PECF594	1,67 μ L
<i>CD19</i>	PerCP Cy5.5	0,83 μ L
<i>CD24</i>	PECy7	0,83 μ L
<i>CD27</i>	AF700	0,83 μ L
<i>CD20</i>	APC-H7	0,83 μ L
<i>Live/dead</i>		0,5 μ L

Tableau 7. Liste d'anticorps du panel humain « LB ».

Les stratégies de *gating* pour les échantillons humains et souris sont développées ci-dessous (Fig.12-13).

Figure 12. Stratégies de *gating* des analyses de cytométrie en flux pour les échantillons



de souris.

Légende Fig.12 : Représentation des stratégies de *gating* utilisées lors de l'analyse des résultats de cytométrie en flux à l'aide du logiciel Flowjo. Toutes les analyses commencent par une première sélection selon la morphologie des cellules, une exclusion des doublets et des cellules mortes grâce à un marqueur de viabilité.

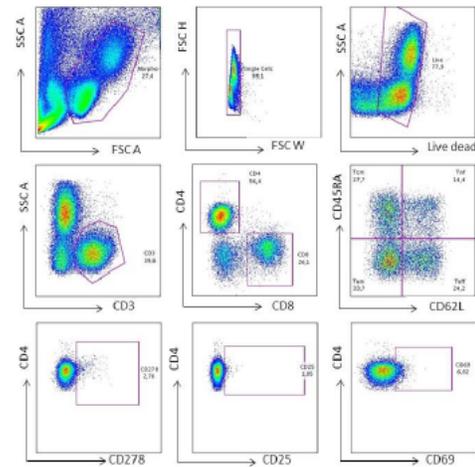
Fig.12A. Après les 3 étapes de sélection des cellules vivantes des cellules du cerveau de souris, l'utilisation des marqueurs CD11b et CD45 permet de différencier la microglie (cellules CD45^{low}CD11b^{low}), l'ensemble des macrophages et de la microglie activée (cellules

CD45^{high}CD11b^{high}) ainsi que les leucocytes (cellules CD11b⁻CD45⁺). L'utilisation des marqueurs CD11b et Ly6G sur les cellules vivantes permet de visualiser les neutrophiles (cellules CD11b⁺Ly6G⁺). L'utilisation des marqueurs Ly6C et CD11b sur les cellules vivantes Ly6G⁻ permet de séparer les monocytes pro-inflammatoires (cellules Ly6G⁻CD11b⁺Ly6C^{high}) et les monocytes anti-inflammatoires (Ly6G⁻CD11b⁺Ly6C^{low}).

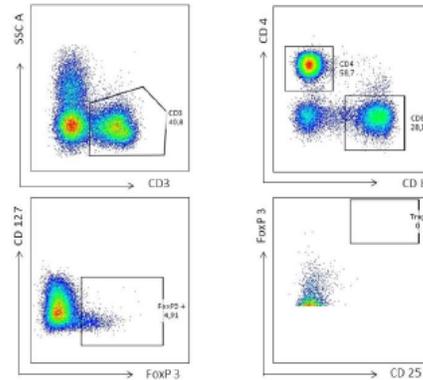
Fig.12B. Après les 3 étapes de sélection des cellules vivantes du sang de souris, l'utilisation du marqueur CD3 permet d'isoler les LT (cellules CD3⁺). Ces LT sont différenciés en LT CD4⁺ ou LT CD8⁺. Chaque sous-population de LT peut être discriminée en LT naïfs (CD44⁻CD62L⁺), LT effecteurs (CD44⁺CD62L⁻) et LT mémoires (CD44⁺CD62L⁺) par l'utilisation des marqueurs CD44 et CD62L. Les neutrophiles, les monocytes pro-inflammatoires et anti-inflammatoires peuvent être classifiés par la même méthode de celle utilisée dans le cerveau des souris.

Figure 13. Stratégies de *gating* des analyses de cytométrie en flux pour le sang humain

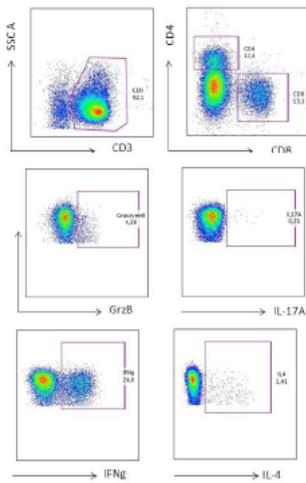
A. Stratégie de *gating* pour le panel « LT »



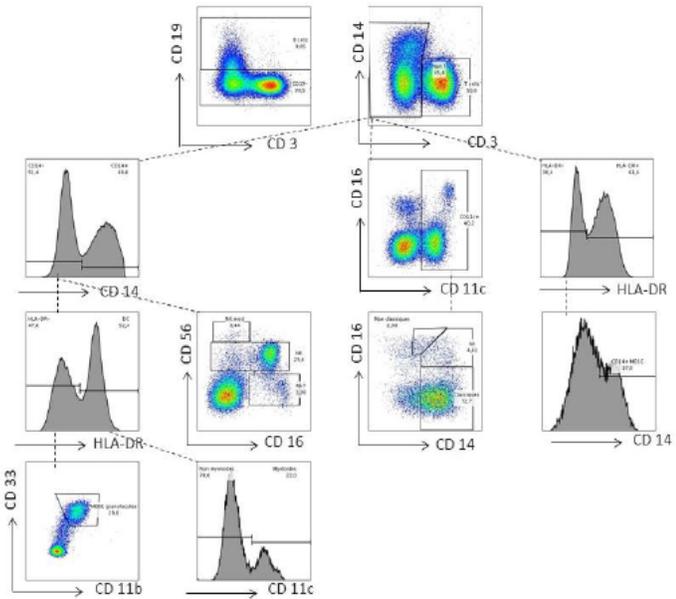
B. Stratégie de *gating* panel « LT Régulateurs » :



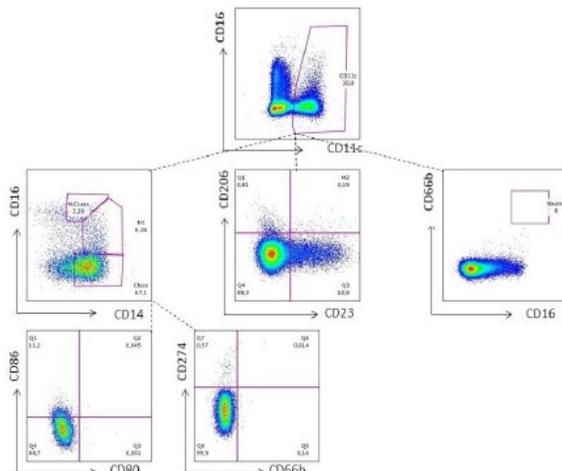
C. Stratégie de *gating* panel « Sécrétion des LT »



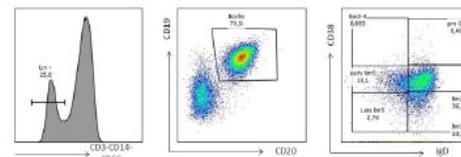
D. Stratégie de *gating* panel « Leucocytes » :



E. Stratégie de *gating* panel « Monocytes »



F. Stratégie de *gating* panel humain « LB »



Légende Fig.13. Représentation des stratégies de *gating* utilisées lors de l'analyse des cellules sanguines du sang de patients HSA par cytométrie en flux à l'aide du logiciel Flowjo. Toutes les analyses commencent par une première sélection selon la morphologie des cellules, une exclusion des doublets et des cellules mortes grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité.

Fig.13A. Après les 3 étapes de sélection des cellules vivantes, les LT sont isolés par l'utilisation du marquage CD3⁺. Les sous-types de LT sont différenciés avec les marqueurs CD4 et CD8. Les différentes classes LT naïfs (LT CD3⁺CD4^{ou}8⁺CD45RA⁺CD62L⁺), LT effecteurs (LT CD3⁺CD4^{ou}8⁺CD45RA⁻CD62L⁺), LT effecteurs mémoires (LT CD3⁺CD4^{ou}8⁺CD45RA⁻CD62L⁻) et LT mémoires centraux (LT CD3⁺CD4^{ou}8⁺CD45RA⁺CD62L⁻) peuvent être déterminés grâce aux marqueurs CD45RA et CD62L. Finalement sur chaque sous-type de LT, nous avons regardé l'expression de différents marqueurs d'activation : CD278, CD25 et CD69.

Fig.13B. Après les 3 étapes de sélection des cellules vivantes, les LT sont isolés par l'utilisation du marquage CD3⁺. Les sous-types de LT sont différenciés avec les marqueurs CD4 et CD8. Les LT régulateurs sont sélectionnés par le marquage CD127⁺FoxP3⁺CD25⁺.

Fig.13C. Après les 3 étapes de sélection des cellules vivantes, les LT sont isolés par l'utilisation du marquage CD3⁺. Les sous-types de LT sont différenciés avec les marqueurs CD4 et CD8. Pour ce panel, les cellules ont été mises en culture 12h dans une plaque incubée pendant 2h à l'OKT3 et maintenues dans du milieu R10 (10% FBS, 1% Pénicilline/Streptomycine, 1% L-glutamine, 1% acides aminés non essential, 1% HEPES, 1% Sodium pyruvate, 0,01% β-mercaptoéthanol) + IL-2 (300ui/réaction, Sigma- Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) + PMA (1 μL/ réaction, Sigma- Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) + Ionomycine (0,8 μL / réaction Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) + Brefeldine A (0,5 μL/réaction, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). La capacité de sécrétion du granzyme B, IL-17A, IFN-γ et IL-4 a ensuite été mesuré.

Fig.13D. Après les 3 étapes de sélection des cellules vivantes, les cellules CD19⁻ sont isolées. Les cellules CD14⁻ permettent la discrimination des cellules NK (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁺CD16⁺), les cellules NK modulateurs (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁺CD16⁻) et les cellules NK anergiques (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁻CD16⁺). Notre panel permet d'isoler les cellules dendritiques (cellules CD3⁻CD14⁻HLA-DR⁺) et de les classer en cellules dendritiques non myéloïdes (cellules CD3⁻CD14⁻HLA-DR⁺CD11c⁻) ou myéloïdes (cellules CD3⁻CD14⁻HLA-DR⁺CD11c⁺). Ce panel permet également de discriminer l'ensemble des monocytes et des macrophages (cellules CD14⁺), les cellules myéloïdes du sang (cellules CD11c⁺), ainsi que les monocytes non classiques (cellules CD11c⁺CD14^{low}CD16^{high}), intermédiaires (cellules CD11c⁺CD14^{high}CD16⁺) et classiques (cellules CD11c⁺CD14^{high}CD16⁻).

Fig.13E. Ce panel nous a permis d'isoler les trois classes de monocytes comme décrits dans la Fig.13D

et d'étudier leur activation avec les marqueurs CD80, C86, CD274 et CD66b. Ce panel contenait également les marqueurs CD206, CD23. Les neutrophiles (CD66b⁺CD16⁺) pouvaient être identifiés à partir de ce panel.

Fig.13F. Ce dernier panel était pour l'étude des LB (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁻CD19⁺CD20⁺). Les marquages CD38-IgD nous ont permis d'étudier les différentes sous-classes des LB.

3. La méthode d'immunofluorescence

3.1. Les généralités sur cette méthode

Les cerveaux prélevés étaient stockés dans de la formaline jusqu'à leur inclusion en paraffine par la plateforme de pathologie moléculaire du CRCHUM. Des coupes de 6 µm d'épaisseur étaient déposées sur une lame et utilisées pour les méthodes d'immunofluorescences. L'immunofluorescence directe est basée sur l'utilisation d'un Ac directement lié à un fluorochrome. L'immunofluorescence indirecte quant à elle nécessite un Ac primaire spécifique de la protéine à cibler et d'un Ac secondaire relié à un fluorochrome spécifique de l'espèce de l'Ac primaire. La composition cellulaire des cerveaux a été évaluée par ces deux méthodes.

Les lames étaient observées au microscope à fluorescence de type Zeiss observer Z1 fluorescent (Zeiss, Oberkochen, Germany) avec le programme AxioVision rel4.8, 6 clichés (3 à proximité de chaque ventricule) par cerveau étaient pris avec un grossissement 20x. Avant la coloration, toutes les lames étaient randomisées par masquage de son origine pour ne pas influencer la prise des photos et le comptage. Lors de la détermination manuelle d'une colocalisation de deux marqueurs différents, nous avons suivi les recommandations trouvées dans la littérature (292) et utilisé deux compteurs qui ne connaissaient pas la nature des lames qu'ils quantifiaient. Le contrôle négatif de ces expériences était une coupe de cerveau présente à chaque expérience sur laquelle les Ac primaires n'étaient pas mis, mais les Ac secondaires oui. L'observation et la quantification des pixels positifs ou de la double colocalisation étaient réalisées à l'aide du logiciel image J (v1.6.0).

3.2. La préparation des lames pour l'immunofluorescence

La combinaison de deux Ac dirigés contre Iba-1 (microglie) et GFAP (astrocytes) nous ont permis d'évaluer le degré d'inflammation cérébrale. Le sous-type de microglie activée a été

déterminé par la colocalisation des marqueurs galectine-3 ou Mac2 (macrophages activés), CD206 (anti-inflammatoire) et iNOS (pro-inflammatoire). La colocalisation des marqueurs NeuN et caspase-3 clivée nous a permis de quantifier la mort neuronale dans notre modèle murin d'HSA.

La première étape de préparation des lames était le déparaffinage. Les lames étaient plongées pendant 5 min dans trois bains successifs de xylène (Chaptec, Montréal, QC, Canada), un bain d'éthanol 100%, un bain d'éthanol 70%, un bain d'éthanol 30% et deux bains d'eau. La deuxième étape est la récupération des AG. Les lames étaient plongées dans un tampon de récupération des AG d'EDTA [1mM EDTA, 0,05% de Tween-20 (Fischer Scientific, St-Laurent, Qc, Canada), pH 8] ou de citrate [10 mM citrate de sodium (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA) 0,05% de Tween-20, pH 6]. Le tampon de récupération des AG était porté et maintenu à ébullition pendant 20 min. Pour ne pas abimer les tissus, les lames étaient refroidies pendant 20 min à température ambiante puis plongées deux fois durant 5 min dans de l'eau. Les coupes de tissus étaient alors entourées d'une marque hydrophobe à l'aide d'un stylo Dako Pen® (Dako, Produktionsvej, Danemark) qui permet de délimiter la zone d'intérêt et de réduire la quantité de matériel nécessaire à une goutte d'environ 150 µL. Le tissu était lavé avec de l'eau et du PBS 1x pendant 5 min. Les membranes étaient perméabilisées avec du tampon de perméabilisation : 0,25% de Triton X-100 (JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA) dilué dans du PBS 1x, pendant 30 min à température ambiante, puis trois lavages au PBS 1x étaient réalisés. Une solution de blocage commerciale était alors appliquée (*BlockAid* solution from Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) pendant une heure à température ambiante. Cette solution permet de bloquer tous les sites de fixation possibles des Ac avant l'application de ces derniers. Ce processus a pour but de limiter les fixations non spécifiques et donc le bruit de fond. Après trois lavages de 5 min dans du PBS 1x, les lames étaient incubées avec les Ac primaires (Tableau VIII) une nuit à 4°C dans une chambre humide. Les Ac primaires utilisés pour la quantification de l'inflammation cérébrale sont l'Ac anti-Iba-1 de souris produit chez le lapin (Wako chemicals, Richmond, VA, USA) et l'Ac anti-GFAP-Cyanine3 de souris produit dans des lignées cellulaires hybridomes (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Le type d'activation microglieuse est identifié par l'Ac anti-Mac-2 de souris produit chez le rat (BioLegend, San Diego, CA, USA) ou l'Ac anti-CD206 de souris produit chez le rat (abcam, Cambridge, UK) et l'Ac anti-iNOS de souris

produit chez le lapin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La mort neuronale est quantifiée par l'utilisation des Ac anti-NeuN de souris (Millipore, Billerica, MA, USA) et l'Ac anti-caspase 3 clivée (Asp175) de la souris produite chez le lapin (Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Le lendemain, les lames étaient lavées trois fois au PBS 1x puis incubées pendant une heure à l'obscurité, à température ambiante avec les Ac secondaires : l'Ac anti-lapin Alexa-647 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), l'Ac anti-souris Alexa-594 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) et l'Ac anti-rat Alexa-488. Les lames étaient finalement lavées trois fois au PBS 1x, séchées, marquées avec du *ProLong Gold Antifade Reagent with 4',6-diamidino-2-phénylindole* (DAPI, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) pour le marquage des noyaux et une lame était montée sur la lame. Après une nuit de repos, les lames étaient prêtes à être observées au microscope.

<i>Ac primaires</i>	<i>Ac secondaires</i>	<i>Marquage</i>
<i>Anti-GFAP-Cy3 (1/1000)</i>		Astrocytes
<i>Anti-Iba-1 (1/200)</i>	Anti-lapin 647 (1/200)	Microglie
<i>Anti-NeuN (1/100)</i>	Anti-souris 594 (1/100)	Neurones
<i>Anti-Caspase-3 clivée (1.50)</i>	Anti-lapin 647 (1/100)	Cellules en apoptose
<i>Anti-Mac 2 (1/50)</i>	Anti-rat Alexa 488 (1/400)	Macrophages
<i>Anti-CD206 (1/1000)</i>	Anti-lapin Alexa 488 (1/200)	Profil M2-like
<i>Anti-iNOS (1/50)</i>	Anti-souris 594 (1/500)	Profil M1-like

Tableau 8. Récapitulatif des Ac utilisés pour l'immunofluorescence.

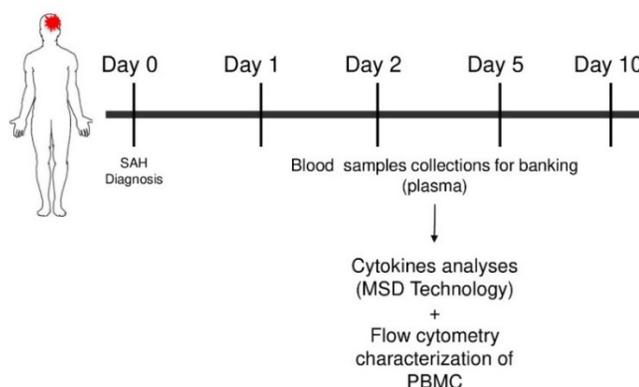
4. Le recrutement des patients HSA

Les patients HSA (n=24, Tableau IX) ont été recrutés au service de soins intensifs du CHUM en moins de 48h après leur diagnostic entre mai 2013 et mai 2019. Le diagnostic était posé par tomodensitométrie ou par la détection de globules rouges et de xanthochromie dans le

LCR. Les patients dont l'HSA était d'origine traumatique, qui possédaient une malformation artérioveineuse ou d'autres types de lésions structurales étaient exclus de l'étude. Les patients qui avaient un cancer, une immunodépression, une insuffisance chronique d'un organe ou une infection virale chronique étaient eux aussi exclus. Tous les patients sélectionnés dans cette étude ont reçu les traitements et les soins recommandés par les lignes directrices cliniques (293). Les patients ont donc reçu 60 mg *per os* de nimodipine toutes les 4h et un traitement chirurgical ou endovasculaire leur était administré dès que possible. Un drain ventriculaire permettant le drainage externe était inséré chirurgicalement en cas de besoin pour traiter une hydrocéphalie symptomatique ou les hémorragies intraventriculaires avec perte de conscience. Un consentement éclairé écrit était obtenu du patient ou d'un représentant légalement autorisé avant l'inclusion des patients dans l'étude. Toutes les études sur des prélèvements de patients ont été approuvées par les comités d'éthique du CHUM et du CRCHUM. Le *modified Rankin scale* (mRS) a été calculé 1 an après le diagnostic. Ce score représente une échelle de sévérité basée sur le devenir du patient et la présence de déficits neurologiques. C'est une échelle de score allant de 0 (aucun symptôme) à 6 (décès du patient). Pour cette étude, les mRS compris entre 0 et 3 sont considérés comme des bons devenirs puisque l'échelle va de l'absence de symptômes à une invalidité modérée. Les mRS compris entre 4 et 6 sont considérés comme des mauvais devenirs, car l'échelle va de l'invalidité sévère à la mort des patients.

Les prélèvements sanguins étaient pris au moment de l'admission (J0), à 24h (J1), à 48h (J2), à 5 jours (J5) et à 10 jours (J10) après le diagnostic. Comme déjà mentionné le plasma était conservé pour une utilisation ultérieure et les PBMC isolés du reste du sang pour les analyses de cytométrie en flux (Fig.14).

Figure 14. Schéma expérimental des prélèvements des patients HSA



Légende Fig.14. Schéma expérimental pour les différentes manipulations sur les prélèvements des patients HSA de ce projet *inspirée et modifiée avec autorisation de (288)*.

À J0, les patients sont recrutés au moment du diagnostic ou dans les 48 premières heures suivant leur hospitalisation (n=24). À J0, J1, J2, J5 et J10, le sang est prélevé, le plasma est mis en banque en attendant les analyses de dosage des cytokines. Le dosage cytokinique des 13 premiers patients recrutés dans ce projet a servi pour la première partie de ce projet. Au total, 24 patients ont été recrutés, les PBMC de tous ces patients ont été analysés pour la troisième partie de ce projet par cytométrie en flux.

Le LCR était prélevé en même temps que le sang (J0, J1, J2, J5 et J10) dans le cas où un drain ventriculaire était installé sur le patient (n=16). Une fois collecté, le LCR était centrifugé 10 min, 1000 g, sans frein, à température ambiante. Le surnageant était récupéré et congelé à -80°C. Le culot composé des cellules et de débris était recentrifugé 10 min, 1500 rpm à température ambiante, resolubilisé dans 1 mL de milieu de congélation (FBS + 10% de DMSO) et conservé à -80°C.

<i>Patient</i> <i>s</i>	<i>Sex</i> <i>e</i>	<i>Âge</i>	<i>WFNS</i> <i>Grade</i>	<i>Fisher</i> <i>grade</i>	<i>mR</i> <i>S</i>	<i>Comorbidités</i>	<i>Prélèvem</i> <i>t sang</i>	<i>Prélèvem</i> <i>t LCR</i>
1	F	59	4	4	3	Hypertension artérielle, dyslipidémie, appendicectomie, amygdalectomie, tabagisme	Oui	Non
2	F	63	2	4	1	Hypertension artérielle	Oui	Oui
3	F	59	5	4	3	Hypertension artérielle, anémie	Oui	Oui
4	F	46	4	4	4	Sclérose en plaques, toxicomanie	Oui	Oui
5	H	51	2	3		Tabagisme	Oui	Non
6	H	51	3	3	1	Tabagisme	Oui	Non
7	H	74	5	3	6	Maladie de Parkinson	Oui	Oui
8	H	55	5	4	5	Anxiété, dépression chronique, alcoolisme	Oui	Oui
9	H	63	5	4	3	Maladie cardiaque athérosclérotique, épilepsie, hypertension artérielle, maladie pulmonaire obstructive chronique	Oui	Oui
10	F	62	5	4	4	Accident automobile-piéton	Oui	Oui
11	F	57	5	4	1	Nil	Oui	Oui
12	F	49	4	4	2	Hypertension artérielle, coliques nephretiques, tabagisme	Oui	Oui
13	H	52	5	4	2	Nil	Oui	Oui
14	H	56	3	3	3	Hypertension artérielle, consommations drogues	Oui	Oui
15	F	72	4	4	3	Maladie de Parkinson, anxiété, hypertension artérielle, hypotension orthostatique	Oui	Oui
16	H	31	5	4	6	Tabagisme	Oui	Oui
17	F	62	2	4	Nil	Maladie cardiaque athérosclérotique, migraine, anévrisme cérébral, hypothyroïdie, dyslipidémie	Oui	Oui
18	H	67	4	4	6	Hypertension artérielle, dyslipidémie	Oui	Oui
19	H	63	1	4	Nil	Nil	Oui	Non
20	F	65	4	3	Nil	Nil	Oui	Oui
21	H	46	2	3	Nil	Nil	Oui	Non
22	F	52	1	4	Nil	Nil	Oui	Non
23	H	54	4	4	Nil	Nil	Oui	Non
24	H	71	5	4	Nil	Nil	Oui	Non
DS1	H	61	N.A	N.A	N.A	Nil	Oui	Non
DS2	H	41	N.A	N.A	N.A	Nil	Oui	Non
DS3	H	29	N.A	N.A	N.A	Nil	Oui	Non
DS4	H	47	N.A	N.A	N.A	Nil	Oui	Non
DS5	H	53	N.A	N.A	N.A	Nil	Oui	Non

Tableau 9. Caractéristiques des participants de cette étude.

Légende Tableau IX : L'âge est celui du patient au moment du diagnostic. H = Hommes et F = Femmes. Les scores, *world federation of neurological surgeons* (WFNS) et score de Fisher ont été déterminés par les médecins qui ont pris en charge les patients. Le mRS a été calculé 1 an après le diagnostic quand cela était possible. Nil = Aucun. N.A= Non applicable.

5. Le dosage des cytokines

Les cytokines, présentes dans le plasma des prélèvements humains ou de souris ainsi que dans le LCR de patients HSA, ont pu être dosées par l'utilisation de kits spécifiques.

Les prélèvements humains (plasma et LCR) ont été dosés par la technologie V-plex de *meso scale discovery* (MSD, Rockville, MD, USA) selon les recommandations du fournisseur. Ce kit permet l'étude de : *c-reactive protein* (CRP), Eotaxine, Eotaxine-3, *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), *intercellular adhesion molecule* (ICAM-1), IFN- γ , IL-10, IL-12/IL-23p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, *interferon-inducible protein* (IP)-10, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), MCP-4, *macrophage-derived chemokine* (MDC), MIP-1 α , MIP-1 β , *placental growth factor* (PlGF), *serum amyloid A* (SAA), *thymus and activation-regulated chemokine* (TARC), *tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains* (Tie)-2, TNF- α , TNF- β , *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1/ *FMS-related tyrosine kinase 1* (Flt-1).

Les différents plasmas de souris ont été analysés à l'aide de la technologie U-plex de MSD (MSD, Rockville, MD) en respectant les recommandations du fournisseur. Ce kit incluait : IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-17A, IL-23 et TNF- α .

6. La culture cellulaire

6.1. L'entretien des cellules

La lignée cellulaire *human microglia clone 3* (HMC3) provenait d'*American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, USA). La lignée HMC3 était entretenue dans le milieu *eagle's minimum essential medium* (EMEM, Multicell, Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada) supplémenté avec 10% FBS. Cette lignée cellulaire était entretenue dans un incubateur humide avec 5% de CO₂ et à 37°C. Pour les expériences, les cellules dont le passage était compris entre 20 et 30 passages étaient utilisées.

6.2. L'évaluation de la production de ROS

La lignée cellulaire HMC3 était stimulée pendant 24h avec de milieu EMEM supplémenté par 10% de LCR ou de sérum de patients HSA. Le milieu normal (MN) de croissance était considéré comme le contrôle négatif et le milieu sans sérum (EMEM seul) était utilisé comme contrôle positif pour la production de ROS. Pour la mesure de la production de ROS, la dihydrorhodamine 123 (DHR, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) était diluée dans le milieu EMEM à une concentration finale de 100 μ M, appliquée directement dans le puits des plaques et incubée pendant 30 min à 37°C. Les cellules étaient ensuite décrochées et transférées dans les tubes de FACS, lavées avec le FACS buffer humain et incubées 30 min avec le marqueur de mort cellulaire. Les cellules finalement lavées étaient prêtes pour la lecture au cytomètre.

6.3. L'évaluation de la capacité de phagocytose

La stimulation et le temps d'incubation de la lignée HMC3 étaient les mêmes que pour l'expérience d'évaluation de la production de ROS. Les billes de latex *detection, carboxylate-modified polystyrene, fluorescent yellow-green latex beads* (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) étaient diluées 1/500 dans le milieu EMEM. À la suite de l'incubation de 1h à 37°C, les puits étaient lavés cinq fois avec 500 μ L de PBS froid. Les cellules étaient alors décrochées et transférées dans des tubes de FACS pour le marquage de mort cellulaire déjà décrit. Après un lavage, les cellules étaient prêtes pour la lecture au cytomètre LSR Fortessa avec le filtre PE-Texas Red.

7. Les analyses statistiques

Les résultats découlant du modèle souris HSA sont exprimés en moyenne +/- l'erreur standard à la moyenne (SEM) et ont été analysés par les tests de Student (avec la correction de Bonferroni si nécessaire).

Pour les analyses de cytokines humaines, une analyse de la variance intragroupe avec des mesures répétées d'ANOVA a été utilisée pour confirmer une variation significative des niveaux de facteurs inflammatoires dérivés du sang dans le temps chez les patients. Les niveaux moyens de médiateurs inflammatoires stratifiés par pronostics de patients : bons (mRS 0-3) ou

mauvais (mRS 4-6) ont été tracés en fonction du temps avec leur intervalle de confiance à 95% en utilisant la fonction `groupwiseMean` du progiciel `rcompanion` du logiciel R. Des régressions logistiques ordinales ont été utilisées pour modéliser l'association entre chaque médiateur inflammatoire dérivé du sérum à l'admission. Un modèle de cotes proportionnelles a été utilisé et était équipé de la fonction « `polr` » du progiciel MASS en R, avec un intervalle de confiance à 95%. Toutes les analyses ont été effectuées en utilisant le logiciel d'analyse statistique R version 3.3.1.

Les résultats de l'évolution des PBMC des patients HSA ont été analysés avec un test *mixed effects regression model*. Lorsque les valeurs ne suivaient pas une distribution normale, les valeurs issues de la transformation logarithmique ont été prises. Ce test permet l'analyse de l'évolution des différents types cellulaires dans le temps en fonction du premier jour de l'étude ou en comparaison aux donneurs sains (DS). Ce type d'analyse nous a permis d'étudier l'effet du temps qui traduit une différence globale des valeurs dans le temps. L'effet temps*groupe nous permet de voir si les groupes étudiés évoluent différemment dans le temps. Enfin, l'effet groupe nous permet de mettre en évidence une différence globale des valeurs entre les groupes. En d'autres termes, l'effet groupe permet de dire si dans l'ensemble les valeurs d'un groupe sont supérieures aux valeurs de l'autre groupe.

Tous les résultats des tests dont la valeur p était strictement inférieure à 0,05 ont été considérés comme significatifs.

Les images de cette thèse ont été dessinées par l'utilisation du site internet biorender.com.

Étude de l'activation de l'immunité innée dans les lésions cérébrales précoces à la suite d'une hémorragie sous-arachnoïdienne (288).

Dans cette première étude, nous avons voulu caractériser l'activation de l'inflammation durant la période des EBI et son implication dans les DCI dans le cas des HSA. Pour cela, nous avons comparé les résultats obtenus avec notre modèle murin d'HSA à ceux de l'analyse des cytokines plasmatiques de 13 patients HSA selon les schémas expérimentaux décrits en Figure 10 et Figure 14.

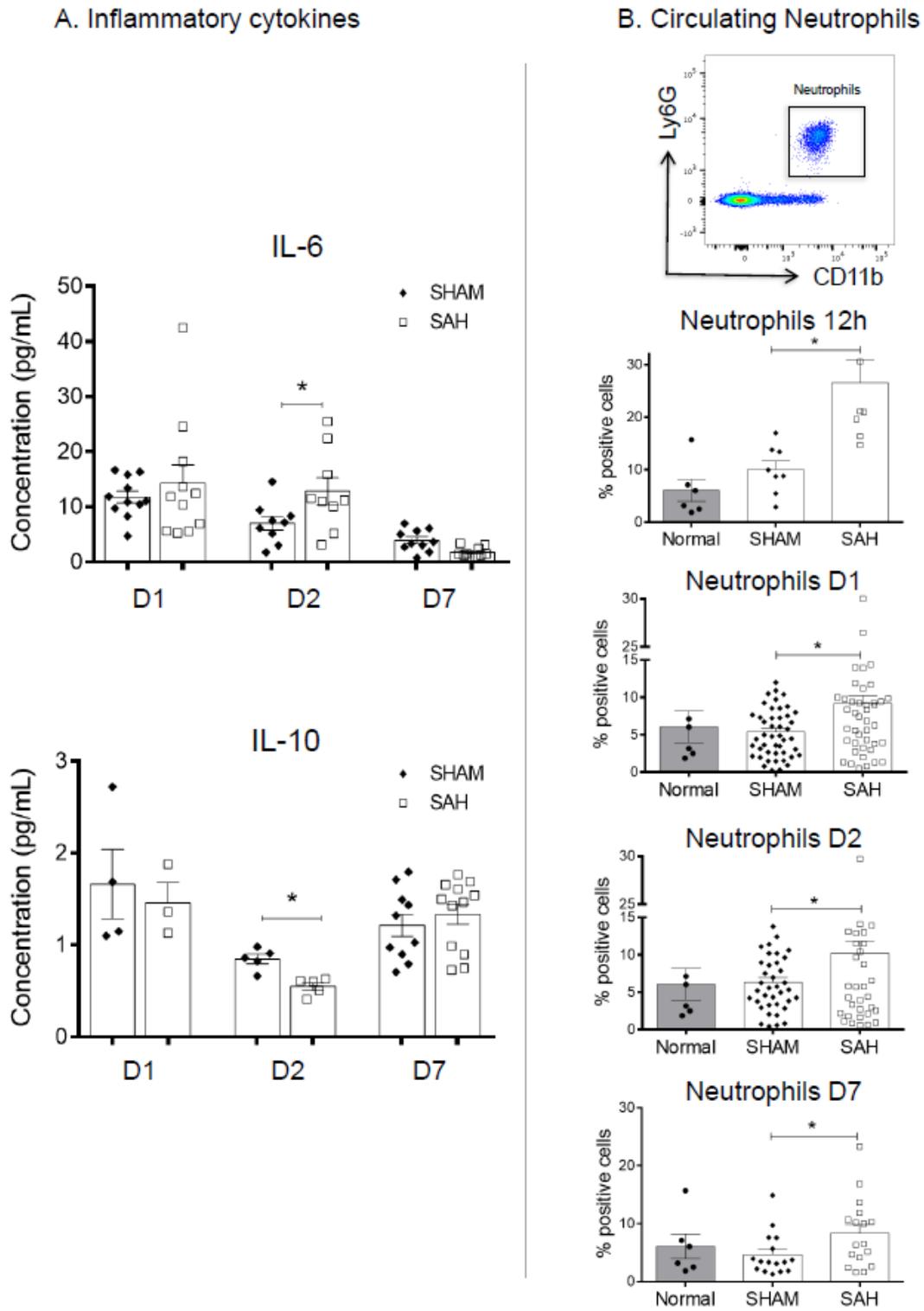
1. L'HSA est liée à l'activation inflammatoire systémique et périphérique dans notre modèle murin.

À la suite de l'induction de l'HSA, nous avons caractérisé la présence de marqueurs inflammatoires systémiques par le dosage des cytokines périphériques dans le plasma des souris. La condition SHAM dans laquelle les souris ont reçu la chirurgie nous a servi de premier contrôle pour valider que les changements observés sont bien la conséquence de l'injection de sang et non de la chirurgie elle-même. Les souris normales WT non manipulées (n=6), nous ont servi de deuxième contrôle afin de valider que notre condition SHAM soit bien similaire à une condition normale et que l'acte chirurgical n'influe pas sur la physiologie des souris. À 24h (nSHAM=4, nHSA=3), nous avons observé une tendance à l'augmentation du niveau d'IL-6, une cytokine pro-inflammatoire et à la diminution de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, chez les souris HSA en comparaison avec les souris contrôles SHAM. À 48h post-HSA (nSHAM=nHSA=5), cette observation est confirmée par l'augmentation significative de l'IL-6 et la diminution significative de l'IL-10 dans le groupe HSA par rapport au groupe SHAM. À J7 (nSHAM=10, nHSA=12), les niveaux des cytokines pour le groupe HSA diminuent et se rapprochent de ceux des souris du groupe SHAM (Fig.15A). Le niveau de cytokines obtenu dans le groupe contrôle (SHAM) est similaire à celui des souris C57BL/6J WT normales répertorié dans la littérature (294, 295). Cela confirme que les variations de l'IL-6 et de l'IL-10 observées sont bien une conséquence de l'induction de l'HSA et non une répercussion de l'acte chirurgical seul. Cependant, le kit que nous avons utilisé incluait d'autres cytokines (IL-7, IL-23, TNF et IL-1 β) qui n'ont pas montré de différence d'évolution entre les groupes SHAM et HSA (résultats non montrés).

Les études de cytométrie en flux sur les cellules sanguines des souris (Fig.12) ont montré la présence d'une neutrophilie marquée et significative ($CD11b^+Ly6G^+$) à tous les temps étudiés [12h (nSHAM=nHSA=8), 24h (nSHAM=51, nHSA=52), 48h (nSHAM=35, nHSA=34), J7 (nSHAM=nSAH=19)] en réponse à l'induction de l'HSA (Fig.15B). Les autres populations cellulaires étudiées (Fig.11), dont les monocytes et les lymphocytes sanguins, ne semblaient pas évoluer différemment entre nos groupes (SHAM, HSA et souris normales) sur les temps étudiés.

Ces premiers résultats confirment que l'induction de l'HSA dans notre modèle souris est associée à l'apparition d'une réponse inflammatoire systémique et périphérique.

Figure 15. L'HSA est liée à la modulation systémique des cytokines inflammatoires et des neutrophiles circulants.



Légende Fig.15. Évaluation de l'inflammation systémique.

Fig.15A. Quantification des niveaux d'IL-6 et d'IL-10 (pg/mL) dans le plasma de souris à 24h (nSHAM=4, nHSA=3), à 48h (nSHAM=nHSA=5) et à 7j (nSHAM=10, nHSA=12). Augmentation significative du niveau d'IL-6 ($p^*=0,049$) et diminution significative du niveau d'IL-10 ($p^*=0,002$) à 48h chez les souris HSA.

Fig.15B. Graphique représentatif de l'isolation des neutrophiles par cytométrie en flux et quantification du pourcentage de neutrophiles (cellules CD11b⁺Ly6G⁺) dans le sang de souris à 12h (nSHAM=nHSA=8), à 24h (nSHAM=51, nHSA=52), à 48h (nSHAM=35, nHSA=34) et à 7j (nSHAM=nHSA=19). Nous avons observé une augmentation significative du pourcentage des neutrophiles au cours des temps étudiés à 12h ($p^*=0,003$), à 24h ($p^*=0,002$), à 48h ($p^*=0,03$) et à 7j ($p^*=0,042$), dans le groupe HSA (carrés blancs) en comparaison avec le groupe SHAM (losanges noirs). Le pourcentage de neutrophiles des souris normales (n=6, cercles noirs) est similaire à celui des souris SHAM.

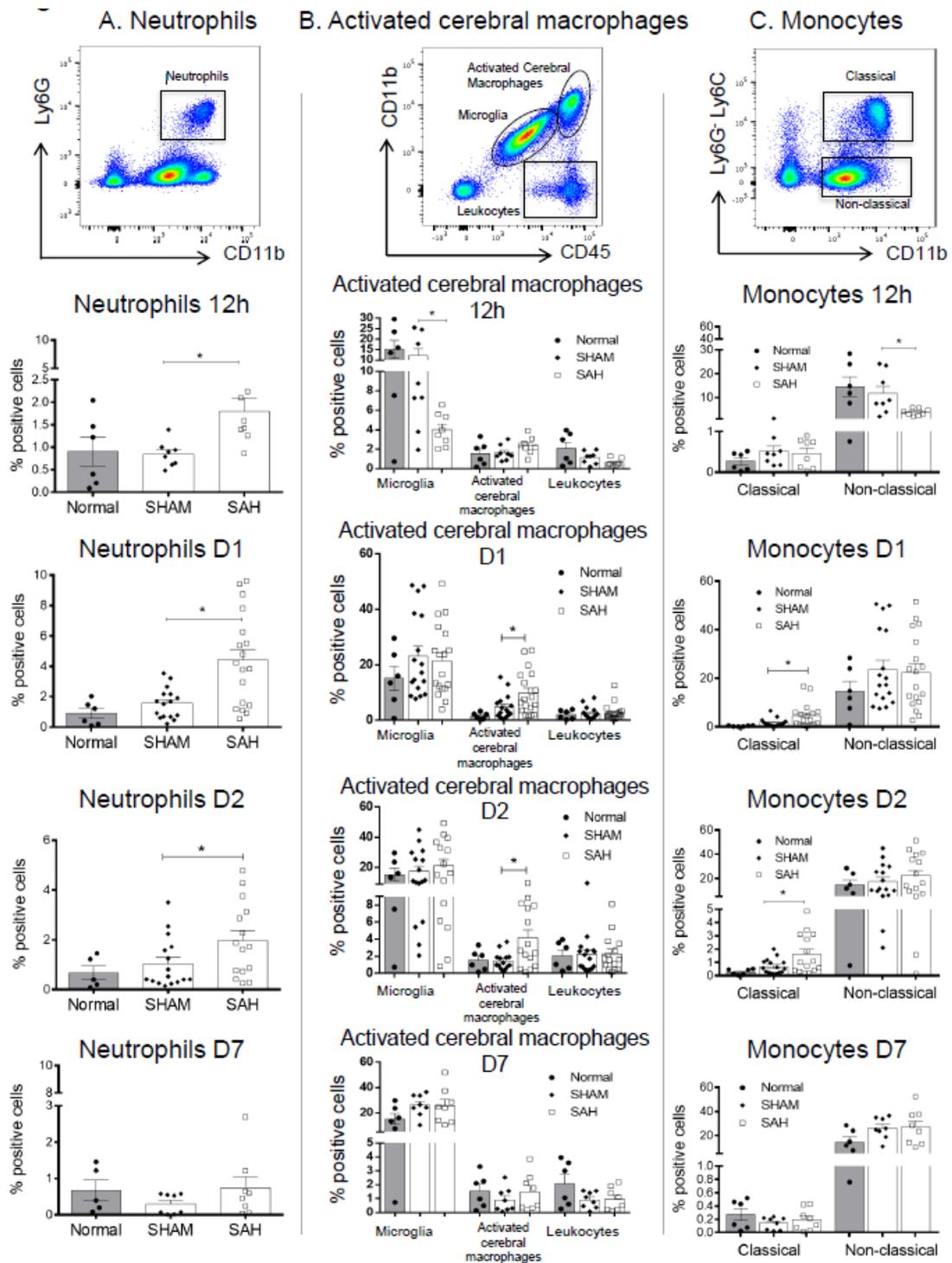
2. L'HSA entraîne le recrutement précoce et l'activation des cellules immunitaires dans le cerveau.

Les études de cytométrie en flux (Fig.12) des types cellulaires provenant de cerveaux digérés de souris nous ont permis d'évaluer l'inflammation cérébrale dans notre modèle HSA. À 12h (nSHAM=nHSA=8), 24h (nSHAM=16, nHSA=18) et 48h (nSHAM=16, nHSA=15), l'induction de l'HSA est liée à l'augmentation significative du nombre de neutrophiles intracérébraux (cellules CD11b⁺Ly6G⁺) dans le groupe HSA comparé au groupe SHAM. Cette différence est perdue à J7 (nSHAM=nHSA=8) où le nombre de neutrophiles semble se rapprocher du niveau observé pour les groupes de souris SHAM et normales (Fig.16A). On note une diminution significative de la microglie (cellules CD45^{low}CD11b^{low}) à 12h ainsi qu'une augmentation significative de l'ensemble de la microglie activée et des macrophages du cerveau (cellules CD45^{high}CD11b^{high}) à 24h et 48h pour le groupe HSA en comparaison au groupe SHAM (Fig.16B). Aux autres temps, aucune différence entre les niveaux de microglie ou de microglie active n'a été observé entre les groupes étudiés. Les leucocytes du cerveau (cellules CD11b⁻CD45⁺) ne semblent pas évoluer différemment dans nos trois groupes étudiés. Dans le but de mieux caractériser le type d'activation des macrophages intracérébraux, l'évaluation du type de monocytes a aussi été faite par l'analyse de cytométrie en flux. À 12h, une diminution

significative des monocytes anti-inflammatoires (cellules Ly6G⁻CD11b⁺Ly6C^{low}) est observée et se répercute à 24h et 48h par l'augmentation significative des monocytes pro-inflammatoires (cellules Ly6G⁻CD11b⁺Ly6C^{high}) dans le groupe HSA comparé au groupe SHAM. À 7j, les niveaux des monocytes pro- et anti-inflammatoires semblent retrouver un niveau proche de celui des souris normales (Fig.16C). De plus, aucune différence significative n'a été détectable entre le groupe normal et le groupe SHAM dans toute cette analyse.

Ces résultats suggèrent donc que l'induction de l'HSA dans notre modèle murin provoque l'activation de l'inflammation cérébrale, elle-même caractérisée par l'activation de la microglie et des macrophages intracérébraux, ainsi que par l'augmentation des monocytes classiques pro-inflammatoires et des neutrophiles dans le cerveau.

Figure 16. L'induction de l'HSA est associée à l'augmentation des neutrophiles, de l'ensemble de la microglie activée et des macrophages ainsi que des monocytes pro-inflammatoires dans le cerveau.



Légende Fig.16. Quantification des cellules du cerveau par cytométrie en flux.

Fig.16A. Graphique représentatif des analyses de cytométrie en flux et de la quantification du pourcentage de neutrophiles (cellules CD11b⁺Ly6G⁺) à 12h (nSHAM=nHSA=8), à 24h (nSHAM=16, nHSA=18), à 48h (nSHAM=16, nHSA=15) et à 7j (nSHAM=nHSA=8).

Nous avons observé une augmentation significative du pourcentage de neutrophiles à 12h (p*=0,008), à 24h (p*=0,001) et à 48h (p*=0,049) dans le groupe HSA en comparaison avec le groupe SHAM.

Fig.16B. Graphique représentatif des analyses de cytométrie en flux et de la quantification du pourcentage de la microglie (cellules CD45^{low}CD11b^{low}), de l'ensemble de la microglie activée et des macrophages (cellules CD45^{high}CD11b^{high}) et des leucocytes infiltrants (cellules CD45⁺CD11b⁻) à 12h, 24h, 48h et 7j.

Nous avons observé une diminution significative du pourcentage de microglie à 12h (p*=0,02) ainsi qu'une augmentation significative du pourcentage de l'ensemble de la microglie activée et des macrophages à 24h (p*=0,03) et à 48h (p*=0,008) dans le groupe HSA en comparaison avec le groupe SHAM.

Fig.16C. Graphique représentatif des analyses de cytométrie en flux et de la quantification du pourcentage de monocytes classiques (cellules Ly6G⁻CD11b⁺Ly6C^{high}) et de monocytes non-classiques (cellules Ly6G⁻CD11b⁺Ly6C^{low}) à 12h, 24h, 48h et 7j.

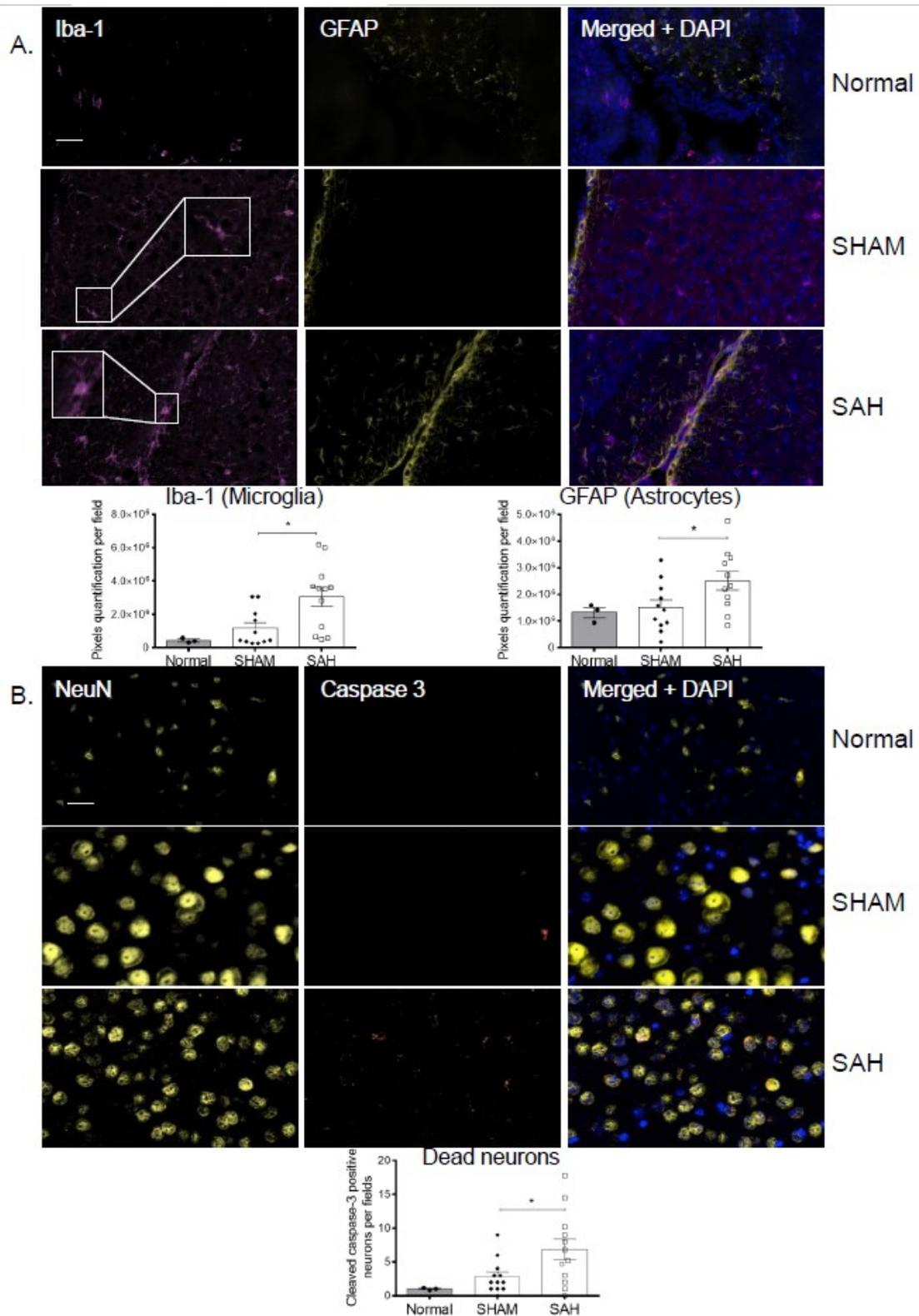
Nous avons observé une diminution significative des monocytes non classiques à 12h (p*=0,02) suivie d'une augmentation significative des monocytes classiques à 24h (p*=0,048) et 48h (p*=0,03) dans le groupe HSA en comparaison avec le groupe SHAM.

3. L'induction de l'HSA favorise l'activation tardive des astrocytes, de la microglie et de la mort neuronale.

L'activation de la microglie et des astrocytes est mesurée par l'utilisation des marqueurs Iba-1 et GFAP sur des coupes de cerveaux de souris inclus en paraffine 7j après l'induction de l'HSA (nSHAM=nHSA=11). Ces méthodes d'immunofluorescence sont souvent utilisées et il est accepté dans la communauté scientifique que l'augmentation de l'intensité de leur marquage traduit l'augmentation de l'activation des astrocytes ou de la microglie (218, 219, 231). Nos résultats montrent une augmentation significative de l'activation des astrocytes et de la microglie 7j après l'induction de l'HSA (Fig.17). Un simple grossissement des images permet d'observer la modification morphologique de la microglie dans le groupe HSA en comparaison avec le groupe normal ou SHAM. Dans les groupes contrôles, les cellules de la microglie ont

des morphologies très ramifiées ce qui rappelle celle de la microglie résidente au repos dont la morphologie dépend de sa fonction de senseur du microenvironnement cérébral. Dans le groupe HSA, les cellules de la microglie ont des corps cellulaires plus gros et une diminution du nombre de ramifications, ce qui rappelle la morphologie amiboïde caractéristique de la microglie activée (296).

Figure 17. L'induction de l'HSA est liée à l'activation locale de la microglie, des astrocytes et de la mort neuronale.



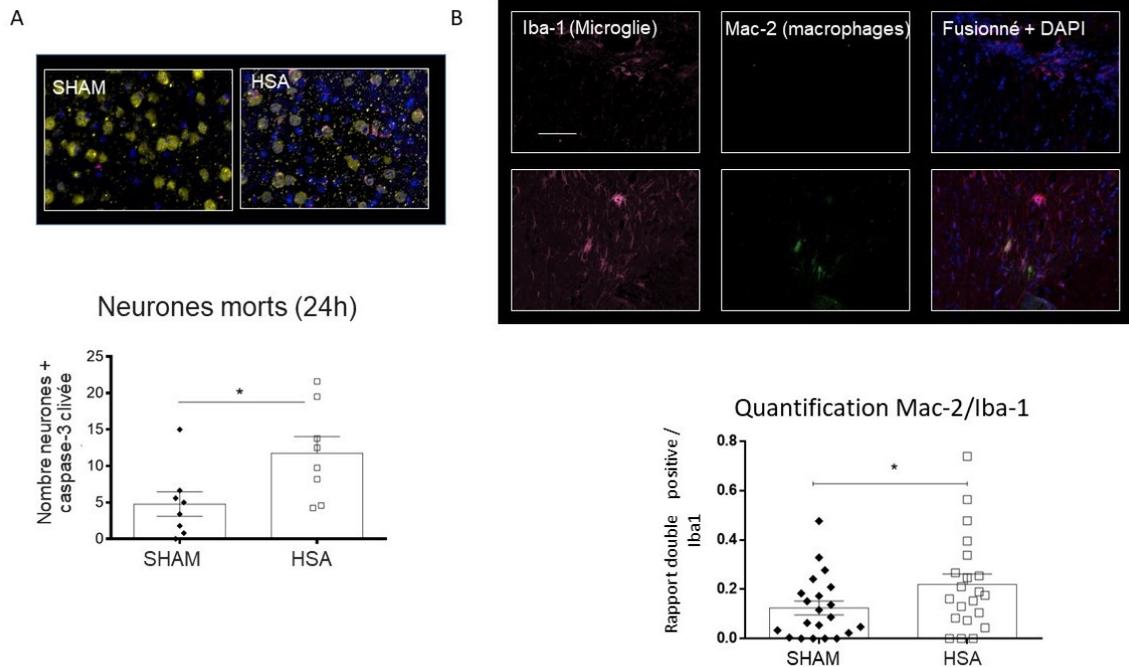
Légende Fig.17. Quantification de l'activation des astrocytes, de la microglie et de la mort neuronale à 7j. Les marquages d'immunofluorescence ont été réalisés sur des coupes de cerveaux inclus en paraffine à 7j (nSHAM=nHSA=11, barre=50µm).

Fig.17A. Images représentatives des marquages de la microglie activée (Iba-1, couleur rose) et des astrocytes (GFAP, couleur jaune) pour les différents groupes (normal, SHAM et HSA). La quantification des pixels positifs par champs a montré une augmentation significative de l'activation de la microglie ($p^*=0,009$) et des astrocytes ($p^*=0,02$) dans le groupe HSA en comparaison avec le groupe SHAM à 7j.

Fig.17B. Images représentatives et quantification du nombre de cellules portant le double marquage Casp-3 (couleur rouge) et NeuN (couleur jaune) par champs dans nos 3 groupes (normal, SHAM et HSA). Ce double marquage permet de définir le nombre de neurones apoptotiques. Nous avons observé une augmentation significative ($p^*=0,01$) de la mort neuronale à 7j dans le groupe HSA en comparaison avec le groupe SHAM.

Le comptage du nombre de cellules portant le double marquage NeuN et caspase-3 clivée nous a permis de quantifier la mort neuronale par apoptose. L'induction de l'HSA dans notre modèle souris est associée à l'augmentation significative de la mort neuronale précoce à 24h (Fig.18) et tardive 7j après l'induction de l'HSA (Fig.17). L'augmentation du nombre de macrophages activés 7j après l'induction de l'HSA a été confirmée par l'augmentation significative du nombre de cellules portant le double marquage Iba-1 et Mac2 dans les cerveaux de souris HSA comparés aux souris SHAM (Fig.18).

Figure 18. Quantification des neurones apoptotiques (24h) et de l'activation de la microglie (7j) dans le cerveau de souris.



Légende Fig.18. Quantification des neurones apoptotiques à 24h et de l'activation de la microglie à 7j sur des coupes de cerveau de souris inclus en paraffine.

Fig.18A. Images représentatives du marquage Caspase-3 et NeuN et quantification du nombre de neurones apoptotiques (nSHAM=nHSA=8) portant le double marquage. Les souris HSA ont augmentation significative ($p^*=0,03$) du nombre de neurones apoptotiques en comparaison avec les souris SHAM.

Fig.18B. Images représentatives du marquage Iba-1 et Mac2 et quantification du rapport du nombre de cellules portant le double marquage/nombre total de cellules Iba1⁺. Nous avons observé une augmentation de ce ratio dans le groupe HSA par rapport au groupe SHAM ($p^*=0,004$).

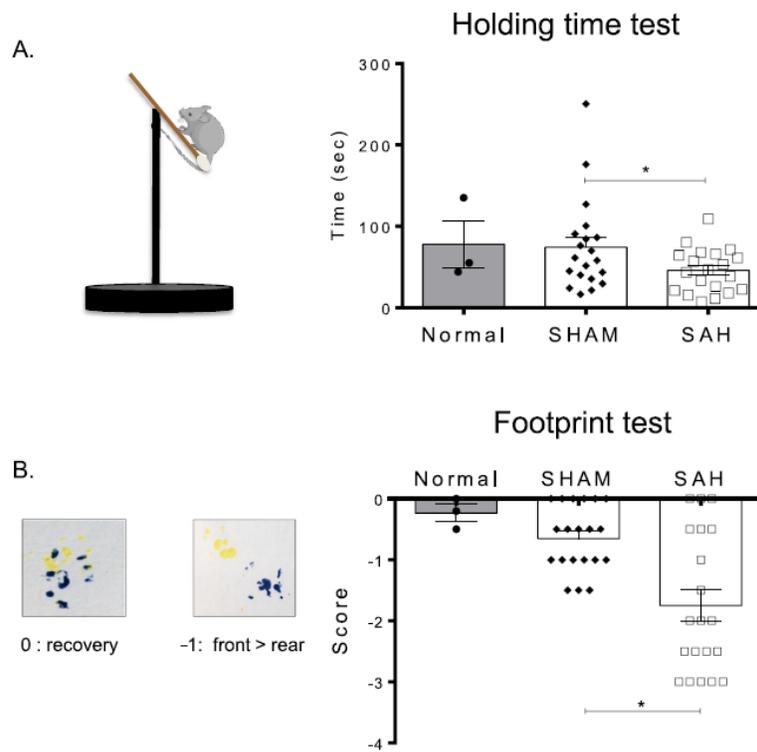
Ces résultats suggèrent que l'induction de l'HSA est liée à l'augmentation de l'activation de la microglie et des astrocytes ainsi que de la mort neuronale tardive (J7).

4. L'induction de l'HSA cause l'apparition de déficits moteurs chez les souris.

Afin de valider le fonctionnement de notre modèle animal et de confirmer que les déficits découlant de l'induction de l'HSA étaient similaires aux symptômes observés chez les patients, nous avons évalué la présence et la nature de ces déficits par deux tests phénotypiques 7j après l'induction de l'HSA (nSHAM=nHSA=19). Les tests utilisés sont des adaptations du *holding time test* et le *footprint test*. Pour le *holding time test*, la diminution significative du temps d'accroche observée pour les souris HSA traduit une diminution de la force musculaire des souris (Fig.19A). La capacité motrice a été évaluée par le *footprint test* et montre une diminution significative de la performance motrice des souris HSA comparées aux souris SHAM (Fig.19B).

Ces résultats confirment donc que notre modèle murin reproduit une HSA dont les effets sont comparables à ce qui est observé chez les patients.

Figure 19. L'induction de l'HSA cause l'apparition de déficits moteurs.



Légende Fig.19. Évaluation de l'apparition des troubles moteurs par deux tests phénotypiques à 7j (nSHAM=nHSA=19 et 3 souris normales).

Fig.19A. Quantification du temps d'accroche en secondes des souris. Le temps d'accroche des souris HSA est significativement inférieur à celui des souris SHAM ($p^*=0,003$).

Fig.19B. Quantification du score à la suite du *footprint test*. Les souris du groupe HSA ont un score significativement plus petit que celui des souris du groupe SHAM ($p^*=0,001$), traduisant l'apparition d'une déficience motrice chez les souris HSA.

5. L'HSA est liée à la présence de marqueurs inflammatoires chez les patients.

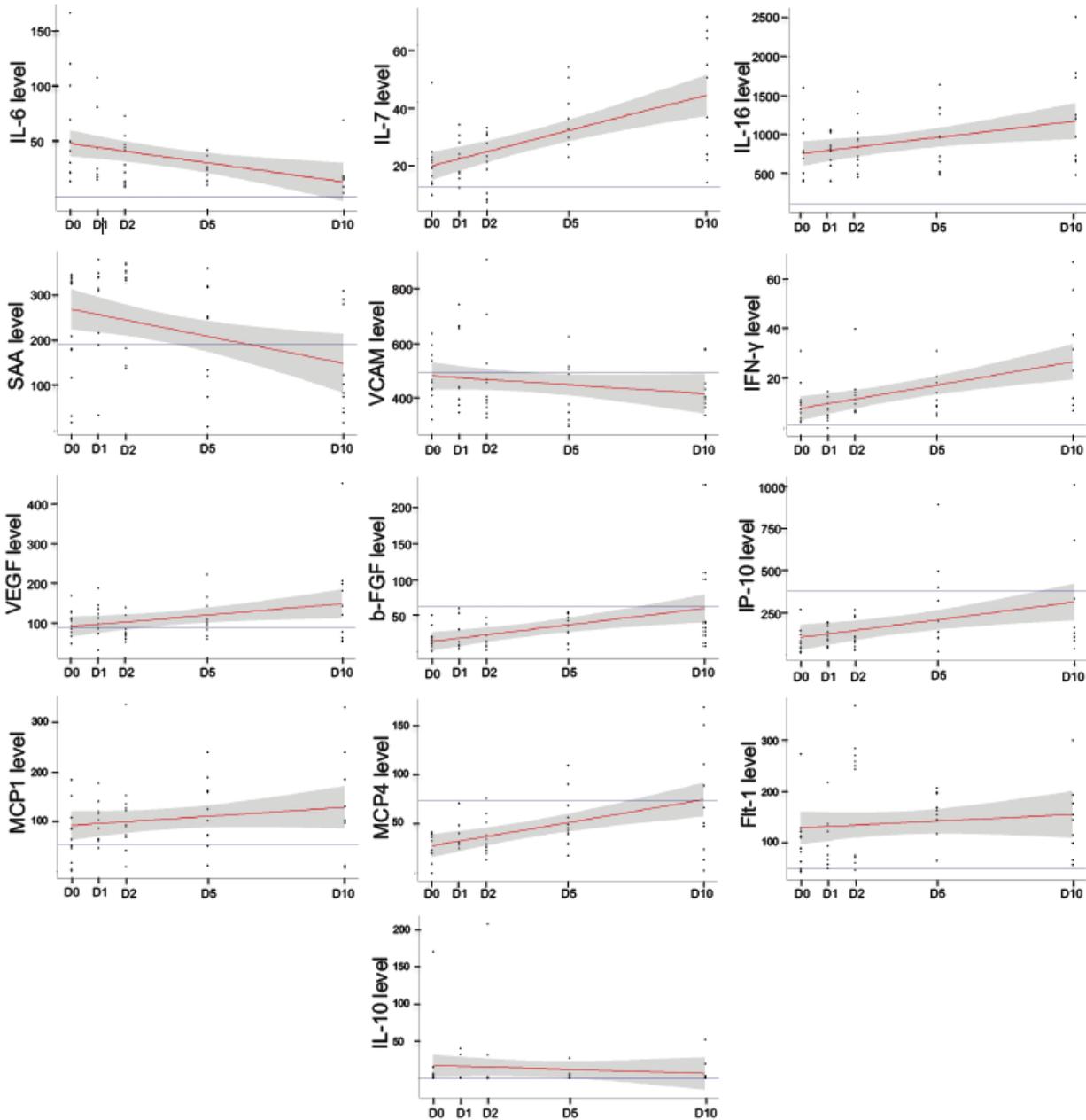
Durant notre première étude, 13 patients ont été recrutés au service de soins intensifs du CHUM. Les caractéristiques des patients sont décrites dans le Tableau IX. La moyenne d'âge des patients est de $57 \pm 2,088$ ans et 53,8% des patientes sont des femmes. De plus, 86% de ces patients présentent des insultes cérébrales importantes correspondantes à un haut grade HSA avec un grade *world federation of neurological surgeons* (WFNS) de 4 ou 5 à l'admission. L'évolution clinique de ces derniers a été évaluée avec le mRS à 1 an et 43% de ces patients présentaient une bonne évolution clinique (mRS 0-3).

À la suite des dosages cytokiniques, nous avons montré que les niveaux de différents marqueurs inflammatoires (IL-6, IL-7, IL-16, SAA, VCAM-1, IFN- γ , VEGF, bFGF, IP-10, MCP-1, MCP-4 et Flt-1) dans le plasma des patients recrutés évoluaient significativement différemment au cours du temps (J0, J1, J2, J5 et J10 après le diagnostic) que les donneurs sains (DS, ligne bleue parallèle à l'axe des abscisses, Fig.20). Nous avons remarqué plusieurs profils d'évolution de ces facteurs au cours du temps chez les patients HSA en comparaison avec les DS. Certains facteurs inflammatoires comme l'IL-6, le Flt-1 et l'IL-10 ont des niveaux stables ou qui diminuent au cours du temps, mais qui restent toujours supérieurs à celui des DS. L'IL-7, l'IL-16, l'IFN- γ , le VEGF et le MCP-1 ont des niveaux qui augmentent au cours du temps et qui sont toujours supérieurs à celui des DS. Le SAA a un niveau élevé dans les temps précoces et supérieur à celui des DS. Son niveau diminue au cours du temps jusqu'à passer en dessous de celui des DS. Le VCAM a des niveaux inférieurs à celui des DS à tous les temps étudiés. Pour finir, les niveaux des facteurs bFGF, IP-10 et MCP-4 sont faibles à des temps précoces et augmentent au cours du temps jusqu'à rejoindre un niveau équivalent à celui des DS (Fig.20).

Dans une dernière analyse, nous avons étudié l'évolution de ces marqueurs inflammatoires en fonction du devenir des patients. Nous avons identifié des facteurs de bon et de mauvais pronostics. Dans les facteurs de mauvais pronostic, certains facteurs inflammatoires (IFN- γ , bFGF, MCP-4 et Flt-1) ont des niveaux supérieurs à tous les temps en comparaison à ceux des patients avec un bon pronostic. L'IL-7 a un niveau supérieur chez les patients avec un bon devenir à tous les temps sauf à J1 et J10. Le VEGF est supérieur dans le groupe avec un mauvais devenir à J0, J1 et J10. L'IL-10 a des niveaux supérieurs à tous les temps, sauf à J2 dans la population avec un mauvais pronostic. Pour les marqueurs de bon pronostic, ICAM-1 a des niveaux supérieurs à tous les temps sauf à J10 dans la population à bon pronostic par rapport aux patients avec un mauvais pronostic. L'IL-12p40 et Tie2 ont des niveaux supérieurs à tous les temps dans la population avec un bon devenir en comparaison à celle avec un mauvais pronostic. Les marqueurs inflammatoires suivants : ICAM-1, bFGF, IL-7, IL-12p40 et MCP-4 ont montré une évolution significativement différente dans le temps lors de la comparaison des patients avec un bon ou un mauvais pronostic (Fig.21). Malgré le petit nombre de patients, l'analyse des niveaux des facteurs inflammatoires sanguins au moment de l'admission a montré des tendances d'associations lors de leur comparaison avec le pronostic des patients (résultats non montrés). L'utilisation de la régression logistique ordinale, nous a permis de constater que des niveaux plus élevés de Flt-1 et de VEGF à l'admission étaient significativement associés à un mauvais pronostic chez les patients : Odds ratio 1,23 (IC 95% 1,004-1,586) et 1,70 (IC 95% 1,05-3,42) respectivement. Cependant, la présence de larges intervalles de confiance pour la plupart des autres médiateurs inflammatoires nous a empêchés d'émettre des conclusions précises sur leur potentiel de prédiction du devenir des patients.

Finalement, cette étude prospective chez les patients HSA nous a permis de confirmer que certains facteurs inflammatoires (cytokines, chimiokines et facteurs de croissance) évoluaient différemment dans le temps et selon le devenir des patients dans notre population étudiée et en comparaison avec des DS.

Figure 20. Évolution des cytokines plasmatiques des patients HSA au cours du temps.



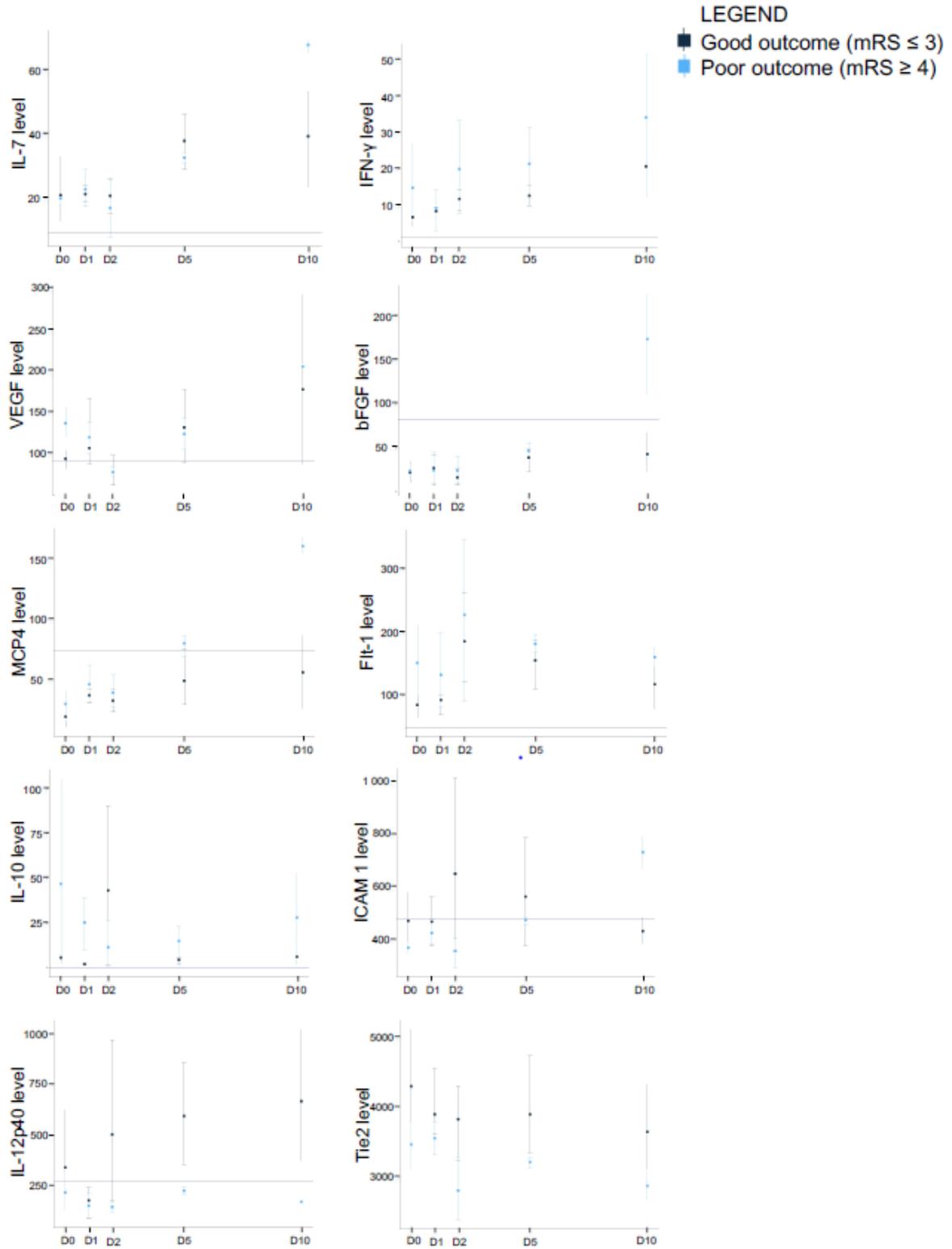
Légende Fig.20. Les sérums de patients HSA ont été analysés par dosage cytokinique à différents temps : au moment du diagnostic, 24h, 48h, 5j et 10j après le diagnostic d’une HSA. La ligne rouge représente cette évolution au cours du temps et zone grisée le SEM des valeurs chez les patients HSA. La ligne grise parallèle à l’axe des abscisses représente la moyenne des niveaux de cytokines de nos 5 DS. Nous avons démontré une variation significative au cours du temps des niveaux des cytokines présentées dans cette figure par l’utilisation d’une analyse de variance ANOVA à mesures répétées.

Tous les facteurs représentés ont une évolution au cours du temps qui varie significativement différemment des DS.

Dans cette première étude, nous avons donc montré que l'infiltration et l'activation précoce des cellules immunitaires innées (neutrophiles, monocytes classiques et l'ensemble des macrophages et de la microglie activée du cerveau) d'origine systémique ou locale précèdent la mort neuronale tardive et l'apparition de déficits moteurs dans notre modèle murin d'HSA. L'analyse des données humaines a attesté la présence de marqueurs inflammatoires en lien avec le pronostic des patients et donc de l'importance de l'inflammation systémique secondaire aux HSA.

La reprogrammation des macrophages issus des monocytes pro-inflammatoires vers un sous-type anti-inflammatoire constitue ici une fenêtre intéressante de recherche. De cette façon, cette reprogrammation pourrait limiter l'apparition de l'inflammation précoce et délétère dans l'HSA. De plus, une meilleure compréhension de l'activation des cellules immunitaires chez les patients HSA pourrait faciliter la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques éventuelles et de potentiels marqueurs de pronostic. Tout ceci dans le but d'améliorer la prise en charge de cette population de patients dans le besoin.

Figure 21. Évolution des cytokines inflammatoires en fonction du pronostic des patients HSA.



Légende Fig.21. Recherche de potentiels marqueurs inflammatoires prédicteurs du devenir des patients au cours du temps (moment du diagnostic, 24h, 48h, 5j et 10j). Dans notre cohorte, 7 patients ont eu un bon devenir (défini par un score mRS compris entre 0 et 3), 3 patients ont eu un mauvais devenir (score mRS compris entre 3 et 6) et 3 patients ont un devenir non connu. Nous avons identifié 7 marqueurs de mauvais pronostic dans notre cohorte : l'IL-7 est supérieure chez les patients avec un bon devenir sauf à 24h et 10j. Le VEGF est supérieur dans le groupe avec un mauvais devenir au moment du diagnostic, à 24h et 10j. L'IFN- γ , le bFGF, le MCP-4 et le Flt-1 sont supérieurs à tous les temps étudiés dans la population avec un mauvais devenir. L'IL-10 a des niveaux supérieurs à tous les temps, sauf à 48h dans la population à mauvais pronostic. Nous avons identifié 3 marqueurs de bon pronostic : ICAM-1 est supérieur à tous les temps sauf à J10 dans la population à bon pronostic. L'IL-12p40 et Tie2 sont supérieurs à tous les temps dans la population avec un bon devenir.

Le traitement par la protéine MFG-E8 diminue l'activation du système immunitaire inné dans l'insulte cérébrale précoce secondaire aux HSA.

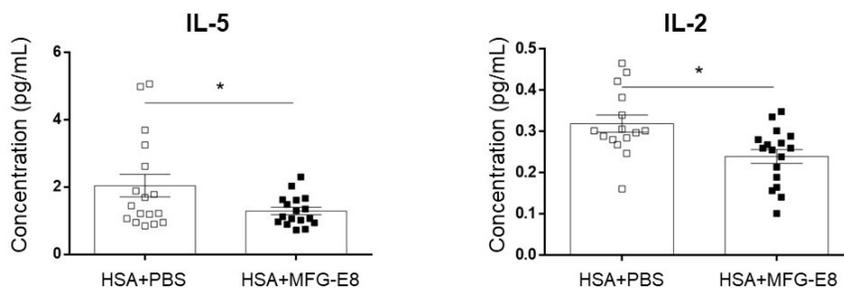
Ayant observé que l'activation du système immunitaire inné, dont les monocytes classiques ainsi que l'ensemble de la microglie activée et des macrophages du cerveau, était associé à l'apparition de déficits moteurs et à la mort neuronale tardive dans notre modèle HSA, nous pensons que la reprogrammation des monocytes et des macrophages vers un profil anti-inflammatoire par l'utilisation de la protéine MFG-E8, pourrait limiter les effets délétères de l'inflammation par la diminution de la mort neuronale ainsi que la survenue des déficits moteurs dans notre modèle murin d'HSA. Les buts à long terme seraient de diminuer la gravité et la survenue des déficits fonctionnels chez les patients HSA en utilisant une protéine naturellement trouvée dans le corps.

Dans cette deuxième étude, nous avons repris toutes les méthodes de la première, mais les souris ont toutes une HSA induite et elles sont traitées par deux injections IP de MFG-E8 recombinante ou de son véhicule (PBS) au moment de la chirurgie et 24h après. Le schéma expérimental de cette étude est décrit dans la Figure 10. Les résultats sur les souris SHAM étant très similaires à ceux des souris normales, nous avons choisi d'étudier l'effet du traitement par la protéine MFG-E8 uniquement chez les souris HSA. Nous avons donc évalué l'activation de l'inflammation systémique et locale par l'utilisation des techniques de cytométrie en flux ainsi que du marquage immunofluorescent. L'apparition des déficits moteurs a été évaluée avec les méthodes déjà décrites précédemment.

1. Le traitement par la protéine MFG-E8 est liée à la diminution de l'activation de l'inflammation systémique précoce chez les souris HSA.

L'analyse des niveaux de cytokines dans le sang de souris à 7j a montré peu de différence sauf pour les cytokines IL-5 et IL-2 qui diminuaient significativement dans le groupe traité au MFG-E8 (Fig.22).

Figure 22. Quantification du niveau de cytokines chez les souris HSA traitées au PBS ou au MFG-E8 7j après l'induction de l'HSA.



Légende Fig.22. Quantification du niveau des cytokines dans le plasma des souris traitées au PBS ou au MFG-E8 en pg/mL (nHSA+PBS=15 ; nHSA+MFG-E8=17).

Les souris HSA traitées au MFG-E8 ont un niveau d'IL-5 ($p^*=0,04$) et d'IL-2 ($p^*=0,005$) significativement inférieur que les souris traitées au PBS.

Par l'utilisation des mêmes analyses de cytométrie en flux que celles décrites dans la première étude (Fig.10) et l'utilisation de prélèvements prospectifs de sang, nous avons observé une diminution significative des neutrophiles (cellules $CD11b^+Ly6G^+$, Fig.23A) 24h après l'induction de l'HSA. À 7j, le nombre de neutrophiles (Fig.23B) semble similaire entre le groupe traité au MFG-E8 et le groupe traité au PBS. Les monocytes pro-inflammatoires (cellules $Ly6G^-CD11b^+Ly6C^{high}$,) circulants sont significativement diminués 24h (Fig.23C) et 7j (Fig.23D) après l'induction de l'HSA dans le groupe traité au MFG-E8 en comparaison avec le groupe traité au PBS.

Ces résultats montrent donc que le traitement par la protéine MFG-E8 dans notre modèle HSA est associé à la diminution de l'activation de l'inflammation systémique.

2. Le traitement par la protéine MFG-E8 diminue les macrophages pro-inflammatoires, l'activation des astrocytes, la mort neuronale et les déficits moteurs associés à l'HSA.

La protéine MFG-E8 étant connue et étudiée dans notre laboratoire pour son implication dans l'orientation de la différenciation des macrophages et des monocytes vers un profil anti-inflammatoire (286, 287), nous avons voulu voir si elle modifiait cet équilibre dans les cerveaux de souris HSA traitées. Par l'utilisation de la technique d'immunofluorescence sur des lames de cerveaux de souris inclus en paraffine 7j après l'induction de l'HSA et des marqueurs CD206 spécifique du profil M2-like et iNOS spécifique du profil M1-like, nous avons calculé le ratio de marqueurs M1/M2 dans le cerveau de ces souris. Nous avons remarqué une diminution significative de ce ratio chez les souris traitées au MFG-E8 en comparaison aux souris traitées au PBS (Fig.23E-F). Ceci traduit une augmentation de la proportion des M2-like et/ou une diminution de la proportion des M1-like dans notre modèle HSA en réponse au traitement par la protéine MFG-E8. Nous avons également étudié l'activation de la microglie et des astrocytes par l'utilisation des mêmes techniques que décrites précédemment. Une diminution non significative du marquage Iba-1 et donc de l'activation de la microglie est notée dans le groupe MFG-E8 (Fig.23G) en comparaison avec le groupe traité au PBS. Cependant, une diminution significative du marquage GFAP, traduisant une diminution de l'activation des astrocytes, est observée 7j après l'induction de l'HSA dans le groupe traité au MFG-E8 en comparaison avec le groupe traité au PBS (Fig.23H). En somme, ces résultats confirment donc l'implication de la protéine MFG-E8 dans la diminution de l'inflammation cérébrale à la suite d'une HSA.

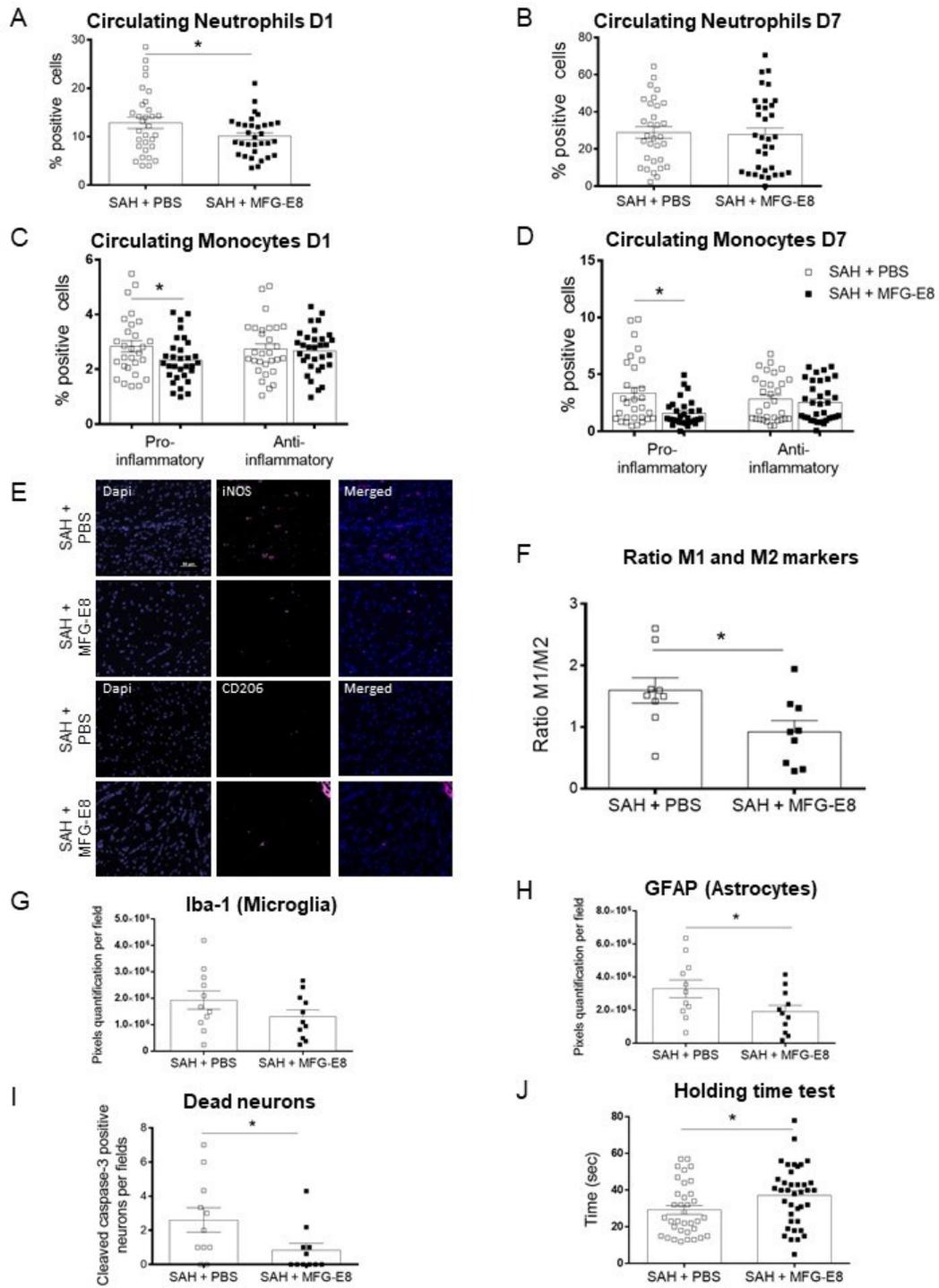
Afin d'évaluer l'aspect bénéfique de cette protéine MFG-E8, nous avons quantifié la mort neuronale 7j après l'induction de l'HSA par le comptage des cellules portant le double marquage NeuN et caspase-3 clivée comme décrit auparavant. Nous avons constaté une diminution significative de la mort des neurones par apoptose dans le groupe traité au MFG-E8 comparé au groupe traité au PBS (Fig.23I).

Finalement, nous avons voulu vérifier que la diminution de l'inflammation locale et systémique constatée par le traitement avec la protéine MFG-E8 influençait le développement des déficits moteurs suivant une HSA. Par la réalisation de deux tests phénotypiques déjà décrits, nous avons observé une augmentation significative du temps d'accroche au cours du *holding*

time test, traduisant une augmentation de la force musculaire des souris et donc une atténuation de la gravité des symptômes dans le groupe traité au MFG-E8 (Fig.23J).

En conclusion, cette deuxième étude nous a permis de décrire l'efficacité du traitement précoce par la protéine MFG-E8 dans la diminution de l'inflammation locale et systémique, de même que dans l'amélioration des symptômes tardifs engendrés par l'induction de l'HSA dans notre modèle murin.

Figure 23. Étude du rôle du traitement avec la protéine MFG-E8 dans notre modèle d'HSA sur les souris.



Légende Fig.23. Étude de l'impact du traitement par la protéine MFG-E8 sur le modèle murin d'HSA. Dans les figures suivantes, chaque point représente les valeurs pour une souris.

Fig.23A. Quantification du pourcentage de neutrophiles (cellules CD11b⁺Ly6G⁺) circulants à 24h par cytométrie en flux (nHSA+PBS=27, nHSA+MFG-E8=29). Cette quantification a montré une diminution significative ($p^*=0,047$) du pourcentage de neutrophiles circulants dans le sang des souris traitées au MFG-E8 (carrés noirs) par rapport aux souris traitées au PBS (carrés blancs) 24h après l'induction de l'HSA.

Fig.23B. Quantification du pourcentage de neutrophiles circulants à 7j par cytométrie en flux (nHSA+PBS=31, nHSA+MFG-E8=34). À 7j, le niveau de neutrophiles circulants est similaire dans le sang des souris de nos deux groupes étudiés.

Fig.23C. Quantification du pourcentage des monocytes circulants à 24h par cytométrie en flux (nHSA+PBS=27, nHSA+MFG-E8=29). Cette quantification a démontré une diminution significative ($p^*=0,046$) du pourcentage de monocytes pro-inflammatoires (Ly6G⁻CD11b⁺Ly6C^{high}) dans le groupe traité au MFG-E8 par rapport au groupe traité au PBS 24h après l'induction de l'HSA. Pour les monocytes anti-inflammatoires (cellules Ly6G⁻CD11b⁺Ly6C^{high}) aucune différence significative n'a été observée entre nos deux groupes.

Fig.23D. Quantification du pourcentage des monocytes circulants à 7j par cytométrie en flux (nHSA+PBS=31, nHSA+MFG-E8=34). Nous constatons une diminution significative ($p^*=0,003$) des monocytes pro-inflammatoires dans le sang 7j après l'induction de l'HSA dans le groupe traité au MFG-E8 en comparaison avec le groupe traité au PBS. Pour les monocytes anti-inflammatoires, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre le groupe HSA traité au MFG-E8 et le groupe HSA traité au PBS.

Fig.23E. Images représentatives de la quantification des marqueurs M1 (iNos, couleur rose) et M2 (CD206, couleur rose) sur des coupes de cerveau de souris inclus en paraffine à 7j (nHSA+PBS=nHSA+MFG-E8=11, barre=50µm).

Fig.23F. Quantification du ratio des marqueurs M1/M2 dans le cerveau de souris à 7j. La quantification montre une diminution significative ($p^*=0,049$) du ratio M1/M2 dans le cerveau des souris HSA traitées au MFG-E8 en comparaison avec les souris HSA traitées au PBS.

Fig.23G. Quantification des pixels positifs de la microglie (Iba-1) sur des coupes de cerveau de souris inclus en paraffine 7j après l'induction de l'HSA. Aucune différence significative n'a pu être mise évidence entre le groupe HSA traité au MFG-E8 et le groupe HSA traité au PBS.

Fig.23H. Quantification des pixels positifs des astrocytes (GFAP) sur des coupes de cerveau de souris inclus en paraffine à 7j. Cette quantification a montré une diminution significative ($p^*=0,049$) de

l'activation des astrocytes dans le cerveau de souris HSA traitées au MFG-E8 en comparaison avec les souris HSA traitées au PBS.

Fig.23I. Quantification du nombre de neurones apoptotiques sur des coupes de cerveau de souris inclus en paraffine à 7j. Nous observons une diminution significative ($p^*=0,04$) du nombre de neurones apoptotique dans le groupe HSA traité au MFG-E8 en comparaison avec le groupe HSA traité au PBS.

Fig.23J. Quantification du temps d'accroche en secondes des souris par le *holding time test* à 7j ($n_{\text{HSA+PBS}}=31$, $n_{\text{HSA+MFG-E8}}=34$). Les souris HSA traitées au MFG-E8 ont un temps d'accroche significativement supérieur ($p^*=0,0305$) que les souris HSA traitées au PBS.

Étude de l'évolution des cellules immunitaires dans le sang de patients HSA.

Dans cette dernière étude, nous avons prélevé le sang et le LCR des patients HSA à différents temps : au moment du diagnostic (J0), J1, J2, J5 et J10 après le diagnostic. Le schéma expérimental est décrit en Figure 14. Les PBMC de chaque prélèvement sanguin ont été isolés. L'utilisation de six panels de cytométrie en flux (Tableaux II-VII) nous a permis de suivre l'évolution des cellules immunitaires sanguines de ces patients. Le but de cette étude était d'être le plus exhaustif possible dans la comparaison de l'évolution des cellules immunitaires avec des DS et entre les différents patients. Nous avons décidé d'étudier l'évolution globale de ces cellules dans le temps pour tous les patients et de les comparer aux valeurs des DS, puis de séparer ces patients en fonction de leur grade HSA au moment du diagnostic. Nous avons dichotomisé notre population de patients en haut grade (HG) et bas grade (BG) en fonction du score WFNS au moment de leur diagnostic. Les patients HG avaient un score compris entre 4 et 5 et les patients BG un score compris entre 1 et 3. Sensibles à l'optimisation de la médecine personnalisée, nous avons regardé si l'évolution de ces cellules immunitaires était différente en fonction du genre des patients. Finalement, nous avons étudié l'impact de l'application du sérum ou du LCR de patients HSA sur une lignée cellulaire de microglie. L'objectif de cette expérience était de valider l'impact pro-inflammatoire de ces échantillons par l'évaluation *in vitro* de la production de ROS et de la capacité de phagocytose de la microglie.

Notre cohorte est composée de 24 patients dont les caractéristiques sont décrites dans le tableau IX. La moyenne d'âge de ces patients est de $57,5 \pm 1,97$ an. Dans cette cohorte de patients, 11 sont des femmes (45,8%) et 13 sont des hommes (54,2%). La moyenne d'âge des femmes est de $58,73 \pm 2,26$ ans et celles des hommes est de $56,46 \pm 3,16$ ans. Dans la cohorte totale, 16 patients (66,6%) sont des HG et 8 patients (33,3%) sont de BG. Chez les femmes, 8 patientes (72,7%) sont de HG et 3 patientes (27,3%) sont des BG. Chez les hommes, 8 patients (61,5%) sont des HG et 5 patients (38,5%) sont des BG. Nous avons calculé le devenir des patients avec le mRS à un an quand c'était possible. En ce qui concerne le devenir des patients chez les femmes, sur 7 patientes HG, 2 patientes (28,5%) ont un mauvais devenir (mRS compris entre 4 et 6) avec chacune un score de 4. Chez les hommes sur 8 patients HG, 4 patients (66,6%) ont un mauvais devenir avec un mRS moyen de 5,75. Pour la seule patiente BG où le mRS a été calculé, nous constatons que son mRS est bon avec un score de 1. Chez les hommes sur

3 patients BG, 1 patient (33,3%) a un mauvais mRS avec un score de 4. Les deux autres patients ont un bon mRS avec une moyenne de score de 1,5. Ces résultats suggèrent que dans notre cohorte, malgré le fait que les hommes ont une HSA à un âge moyen plus jeune que les femmes et que leur diagnostic est moins grave à l'arrivée, ils semblent avoir un moins bon devenir.

1. Étude de l'évolution des cellules immunitaires dans le temps.

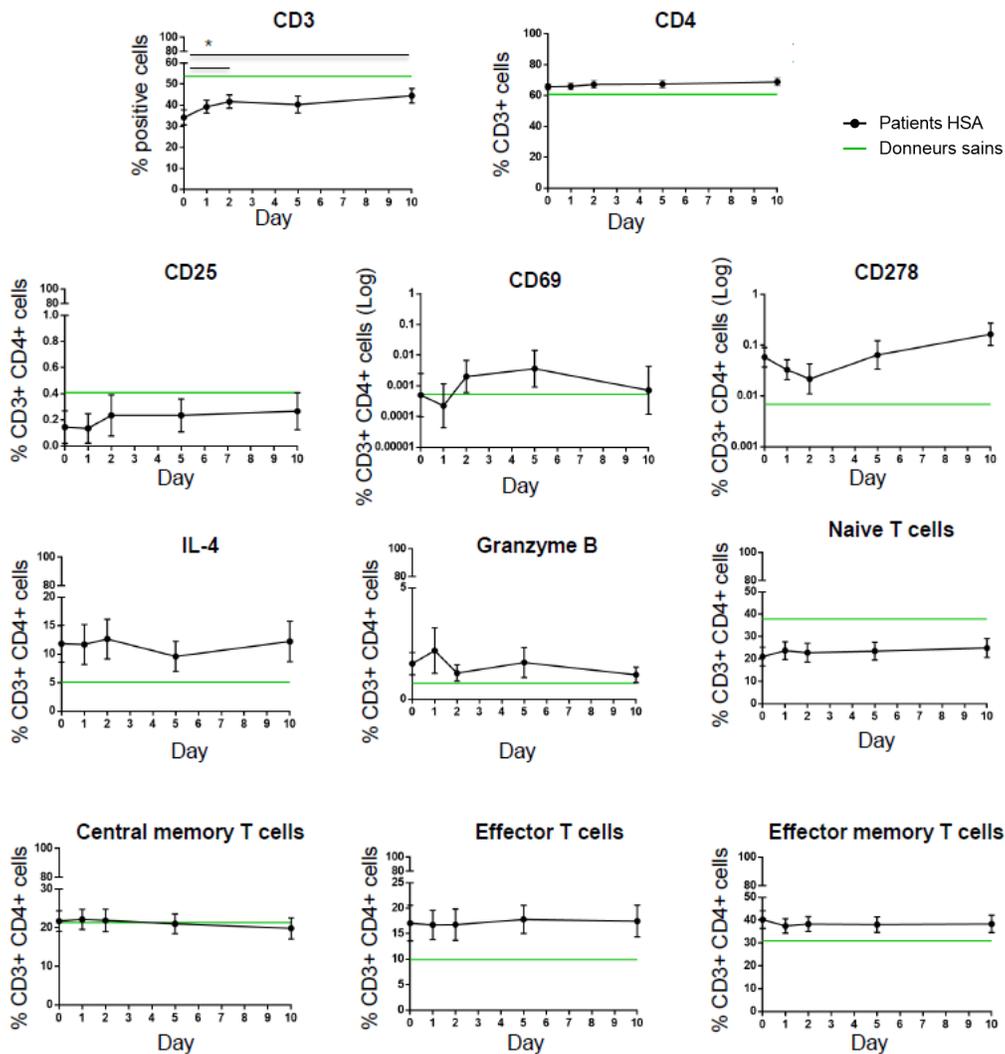
Dans cette première partie, nous avons étudié l'évolution des cellules immunitaires dans le sang des patients de notre cohorte en fonction du jour du diagnostic des patients (J0) et en fonction des valeurs obtenues chez les DS.

1.1. Les patients HSA sont caractérisés par l'augmentation du pourcentage des cellules immunitaires innées.

Les patients HSA sont caractérisés par un pourcentage de LT (CD3⁺) significativement inférieur à celui des DS à tous les temps étudiés. Cependant, les LT ont une évolution significative au cours du temps chez les patients HSA caractérisée par une augmentation progressive entre J0 et J10. De plus, le pourcentage des LT des patients HSA est significativement inférieur à celui des DS à J2 et J10. Le pourcentage des LT CD4⁺ est constant dans le temps et similaire à celui des DS. D'ailleurs, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HSA et les DS ou concernant l'évolution dans le temps du pourcentage des LT CD4⁺ chez les patients HSA. Lorsque l'on regarde le profil d'activation des LT CD4⁺, aucune différence significative n'a été observée concernant le pourcentage des LT CD4⁺CD25⁺ et des LT CD4⁺CD69⁺, dans nos analyses caractérisant l'évolution au cours du temps chez les patients HSA ou en comparant ces pourcentages entre les patients et les DS. Malgré cela, nous constatons une évolution au cours du temps du pourcentage des LT CD4⁺CD278⁺ significative différente par rapport à J0 chez les patients HSA avec un pourcentage qui diminue jusqu'à J2 puis qui augmente jusqu'à J10. De plus, le pourcentage des LT CD4⁺CD278⁺ est significativement supérieur à celui des DS pour tous les temps étudiés. Aucune différence significative n'a été mise en évidence concernant la capacité de sécrétion de l'IL-4 et du granzyme B dans nos analyses caractérisant l'évolution au cours du temps chez les patients HSA par rapport à J0 ou comparant les valeurs obtenues entre les patients

HSA patients et les DS. Malgré l'absence d'évolution significative en comparaison avec J0 du pourcentage de LT CD4⁺ naïfs (cellules CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺) chez les patients HSA, nous constatons que leur pourcentage est significativement inférieur à celui des DS pour tous les temps étudiés. Pour finir, concernant les pourcentages de LT CD4⁺ mémoires centraux (cellules CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁻), effecteurs (cellules CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD62L⁺) ou effecteurs mémoires (cellules CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD62L⁻), aucune différence significative n'a été mise en évidence dans nos analyses caractérisant l'évolution au cours du temps chez les patients HSA par rapport à J0 ou comparant les valeurs obtenues entre les patients HSA et les DS (Fig.24).

Figure 24. Évolution des LT CD4⁺ au cours du temps chez les patients HSA.



Légende Fig.24. Analyse de l'évolution des LT CD4⁺ des patients HSA au cours du temps. Cette figure présente les résultats obtenus durant l'analyse de cytométrie en flux des PBMC du sang des patients HSA (panels 1 à 3). Les cellules CD3⁺ proviennent d'une sélection initiale selon la morphologie excluant les doublets et les cellules mortes grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité cellulaire. Deux types d'analyses statistiques découlent de ces données, une caractérisant l'évolution des cellules immunitaires au cours du temps chez les patients HSA (par comparaison avec les pourcentages obtenus à J0) et une comparant les valeurs obtenues chez les patients HSA avec celles des DS. La courbe noire représente la moyenne des pourcentages des cellules obtenus chez l'ensemble des patients HSA de notre cohorte (n=24) et la droite verte représente la moyenne des pourcentages obtenus chez nos DS (n=5). Afin d'alléger le contenu, seules les valeurs des résultats statistiquement significatifs seront

présentées dans cette section.

Le pourcentage de LT CD3⁺ est significativement inférieur à celui des DS au cours des temps étudiés (p*=0,0001). Il existe une variation statistique du pourcentage des LT CD3⁺ au cours du temps chez les patients HSA en comparaison avec J0 (p*=0,02). À J2 (p*=0,04) et J10 (p*=0,008), le pourcentage des LT CD3⁺ chez les patients HSA est significativement supérieur à celui à J0.

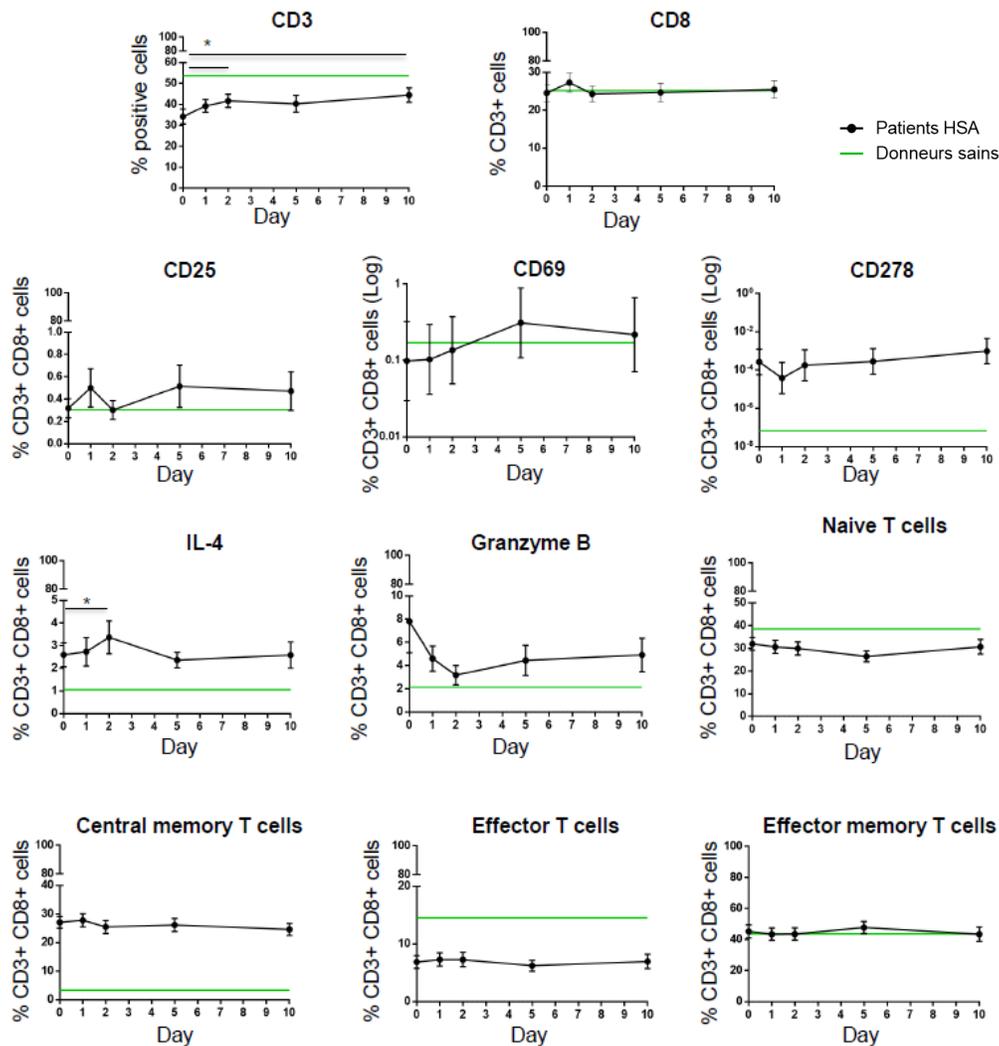
Le pourcentage de LT CD3⁺CD4⁺CD278⁺ est significativement supérieur chez les patients HSA en comparaison à celui des DS au cours des temps étudiés (p*=0,0007). Il existe une variation statistique de l'évolution du pourcentage des LT CD3⁺CD4⁺CD278⁺ au cours du temps chez les patients HSA en comparaison avec J0 (p*=0,01)

Le pourcentage de LT CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺ (LT naïfs) est significativement supérieur à celui des DS au cours des temps étudiés (p*=0,0007).

Les pourcentages de LT CD8⁺, de LT CD8⁺CD25⁺ et de LT CD8⁺CD69⁺ sont similaires à ceux des DS et aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HSA et les DS ou concernant l'évolution dans le temps du pourcentage des LT CD8⁺, de LT CD8⁺CD25⁺ et de LT CD8⁺CD69⁺ chez les patients HSA. Cependant, le pourcentage de LT CD8⁺CD278⁺ est significativement supérieur à celui des DS à tous les temps étudiés et leur évolution est significativement différente par rapport à J0 chez les patients HSA, car le pourcentage de LT CD8⁺CD278⁺ augmente progressivement au cours du temps. Cette augmentation de l'expression de ce marqueur traduit une augmentation de l'activation des LT CD8⁺. Le niveau de sécrétion de l'IL-4 par les LT CD8⁺ chez les patients HSA est significativement supérieur à celui des DS. Même si l'évolution de ce profil de sécrétion chez les patients HSA n'est pas statistiquement différente au cours du temps par rapport à J0, nous constatons une augmentation significative de cette production à J2 par rapport à J0 chez les patients HSA. Cependant, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HSA et les DS ou concernant l'évolution dans le temps du niveau de production du granzyme B par les LT CD8⁺ chez les patients HSA. Nous constatons que le pourcentage de LT CD8⁺ naïfs (LT CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺) est significativement inférieur chez les patients HSA par rapport aux DS au cours du temps. Le pourcentage des LT CD8⁺ mémoires centraux (LT CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻) est significativement supérieur à celui des DS au cours du temps. Le pourcentage des LT CD8⁺

effecteurs (LT CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁺) est significativement inférieur à celui des DS au cours du temps. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HSA et les DS ou concernant l'évolution dans le temps du pourcentage des LT CD8⁺ effecteurs mémoires (LT CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁻) chez les patients HSA (Fig.25).

Figure 25. Évolution des LT CD8⁺ au cours du temps chez les patients HSA.



Légende Fig.25. Analyse de l'évolution des LT CD8⁺ des patients HSA au cours du temps. Cette figure présente les résultats obtenus durant l'analyse de cytométrie en flux des PBMC du sang des patients HSA (panels 1 à 3). Les cellules CD3⁺ proviennent d'une sélection initiale selon la morphologie excluant les doublets et les cellules mortes grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité cellulaire. Deux types d'analyses statistiques découlent de ces données, une caractérisant l'évolution des cellules immunitaires au cours du temps chez les patients HSA (par comparaison avec les pourcentages obtenus à J0) et une comparant les valeurs obtenues chez les patients HSA avec celles des DS. La courbe noire représente la moyenne des pourcentages des cellules obtenus chez l'ensemble des patients HSA de notre cohorte (n=24) et la droite verte représente la moyenne des pourcentages obtenus chez nos DS (n=5). Afin d'alléger le contenu, seules les valeurs des résultats statistiquement significatifs seront

présentées dans cette section.

Le pourcentage de LT CD3⁺CD8⁺CD278⁺ est significativement supérieur à celui des DS au cours des temps étudiés (p*=0,02). Ce pourcentage augmente de façon significative au cours du temps chez les patients HSA par rapport à J0 (p*=0,03).

Le niveau de sécrétion de l'IL-4 par les LT CD3⁺CD8⁺ est significativement supérieur chez les patients HSA que chez les DS au cours des temps étudiés (p*=0,0002). Cette sécrétion est significativement supérieure à J2 en comparaison à J0 chez les patients HSA (p*=0,01).

Le pourcentage des LT naïfs (cellules CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺) est significativement inférieur chez les patients HSA en comparaison aux DS au cours de temps (p*=0,0001).

Le pourcentage des LT mémoires centraux (cellules CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻) est significativement supérieur chez les patients HSA en comparaison avec celui des DS au cours du temps (p*=0,0001).

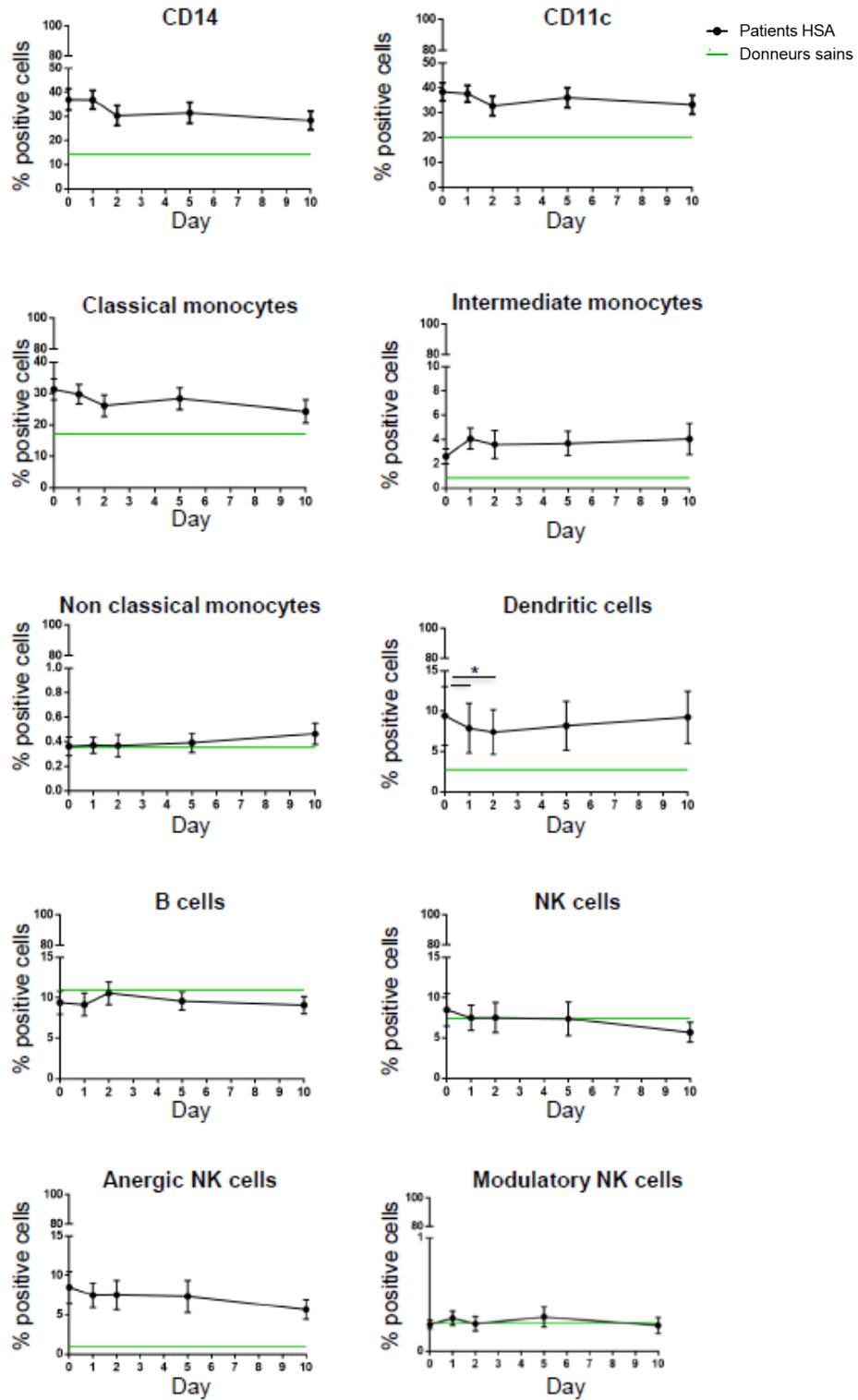
Le pourcentage des LT effecteurs (cellules CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁺) est significativement inférieur à celui des DS au cours du temps (p*=0,0001).

Somme toute, l'étude de l'évolution du pourcentage et de l'activation des LT montre une diminution du pourcentage des LT CD3⁺ chez les patients HSA par rapport aux DS, ainsi qu'une augmentation de leur activation par l'expression significativement supérieure du marqueur CD278 chez les LT CD4⁺ et les LT CD8⁺. De plus, l'augmentation significative de la sécrétion de l'IL-4 traduit une augmentation des Th2 qui sont impliqués dans l'activation des M2 et dans la résolution de l'inflammation chronique.

L'ensemble des monocytes totaux et des macrophages sanguins (cellules CD14⁺) est caractérisé par un pourcentage significativement supérieur à celui des DS à tous les temps étudiés chez les patients HSA. De plus, son évolution est statistiquement significative par rapport à J0 chez les patients HSA. Elle est définie par une diminution progressive au cours du temps, mais les pourcentages restent supérieurs à ceux des DS pour tous les temps étudiés. Le pourcentage de marquage CD11c correspond au nombre de cellules myéloïdes dans le sang des patients. Nous remarquons que la proportion de cellules CD11c⁺ demeure significativement supérieure chez les patients HSA en comparaison à celle des DS au cours du temps. Les pourcentages de monocytes classiques (cellules CD11c⁺CD14^{high}CD16⁻) et intermédiaires (cellules CD11c⁺CD14^{high}CD16⁺) sont également caractérisés par des proportions élevées qui

restent significativement supérieures à celles des DS pour tous les temps étudiés. Cependant, nous n'avons pas constaté de différence entre les valeurs du pourcentage de monocytes non classiques (cellules CD11c⁺CD14^{low}CD16^{high}) entre les patients HSA et les DS au cours du temps. Les DC (cellules CD3⁻CD14⁻HLA-DR⁺) des patients HSA ont également un pourcentage significativement supérieur à celui des DS au cours du temps. Nous observons une diminution significative du pourcentage de cellules dendritiques à J1 et J2 en comparaison avec J0. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HSA et les DS ou concernant l'évolution dans le temps du pourcentage des LB (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁻CD19⁺CD20⁺). Le pourcentage des cellules NK (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁺CD16⁺) diminue progressivement au cours du temps et de façon significative par rapport à J0 chez les patients HSA. Cependant, ce pourcentage de cellules NK chez les patients HSA n'est pas différent de celui des DS. Le pourcentage des cellules NK anergiques (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁻CD16⁺) chez les patients HSA est significativement supérieur à celui des DS au cours du temps. Ce pourcentage diminue progressivement et significativement au cours du temps chez les patients HSA en comparaison avec J0. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HSA et les DS ou concernant l'évolution dans le temps du pourcentage des NK modulateurs (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁺CD16⁻) (Fig.26).

Figure 26. Évolution des autres leucocytes au cours du temps chez les patients HSA.



Légende Fig.26. Analyse de l'évolution des cellules immunitaires innées et des LB des patients HSA au cours du temps. Cette figure présente les résultats obtenus durant l'analyse de cytométrie en flux des PBMC du sang des patients HSA (panels 4 à 6). Les cellules CD14⁺ proviennent d'une sélection initiale selon la morphologie excluant les doublets et les cellules mortes grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité cellulaire. Deux types d'analyses statistiques découlent de ces données, une caractérisant l'évolution des cellules immunitaires au cours du temps chez les patients HSA (par comparaison avec les pourcentages obtenus à J0) et une comparant les valeurs obtenues chez les patients HSA avec celles des DS. La courbe noire représente la moyenne des pourcentages des cellules obtenus chez l'ensemble des patients HSA de notre cohorte (n=24) et la droite verte représente la moyenne des pourcentages obtenus chez nos DS (n=5). Afin d'alléger le contenu, seules les valeurs des résultats statistiquement significatifs seront présentées dans cette section.

Le pourcentage de l'ensemble des monocytes totaux et des macrophages (cellules CD14⁺) est significativement supérieur à celui des DS au cours du temps (p*=0,0001). Ce pourcentage diminue significativement au cours du temps chez les patients HSA en comparaison avec J0 (p*=0,005).

Le pourcentage des cellules myéloïdes sanguines (cellules CD11c⁺) est significativement supérieur à celui des DS au cours du temps (p*=0,0001).

Le pourcentage de monocytes classiques (cellules CD11c⁺CD14^{high}CD16⁻) est significativement supérieur à celui des DS au cours du temps (p*=0,0008).

Le pourcentage de monocytes intermédiaires (cellules CD11c⁺CD14^{high}CD16⁺) est significativement supérieur à celui des DS au cours du temps (p*=0,003).

Le pourcentage des DC (cellules CD3⁻CD14⁻HLA-DR⁺) est supérieur à celui des DS au cours du temps (p*=0,008). Ce pourcentage de DC est significativement diminué à J1 (p*=0,04) et J2 (p*=0,02) en comparaison avec J0 chez les patients HSA.

Le pourcentage des cellules NK (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁺CD16⁺) diminue significativement au cours du temps chez les patients HSA en comparaison avec J0 (p*=0,004).

Le pourcentage de cellules NK anergique (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁻CD16⁺) chez les patients HSA est significativement supérieur à celui des DS au cours du temps (p*=0,0005) et, est marqué par une diminution significative au cours du temps chez les patients HSA en comparaison avec J0 (p*=0,003).

Ces résultats montrent donc que les patients HSA ont un état inflammatoire augmenté par rapport aux DS se traduisant par un pourcentage supérieur des monocytes totaux, des monocytes non classiques, des monocytes intermédiaires et des cellules myéloïdes dans le sang des patients HSA. Ces résultats sont similaires à ceux de notre modèle murin HSA. Le tableau X

ci-dessous, récapitule les différences observées entre les souris HSA par rapport aux souris SHAM et les patients HSA par rapport aux DS.

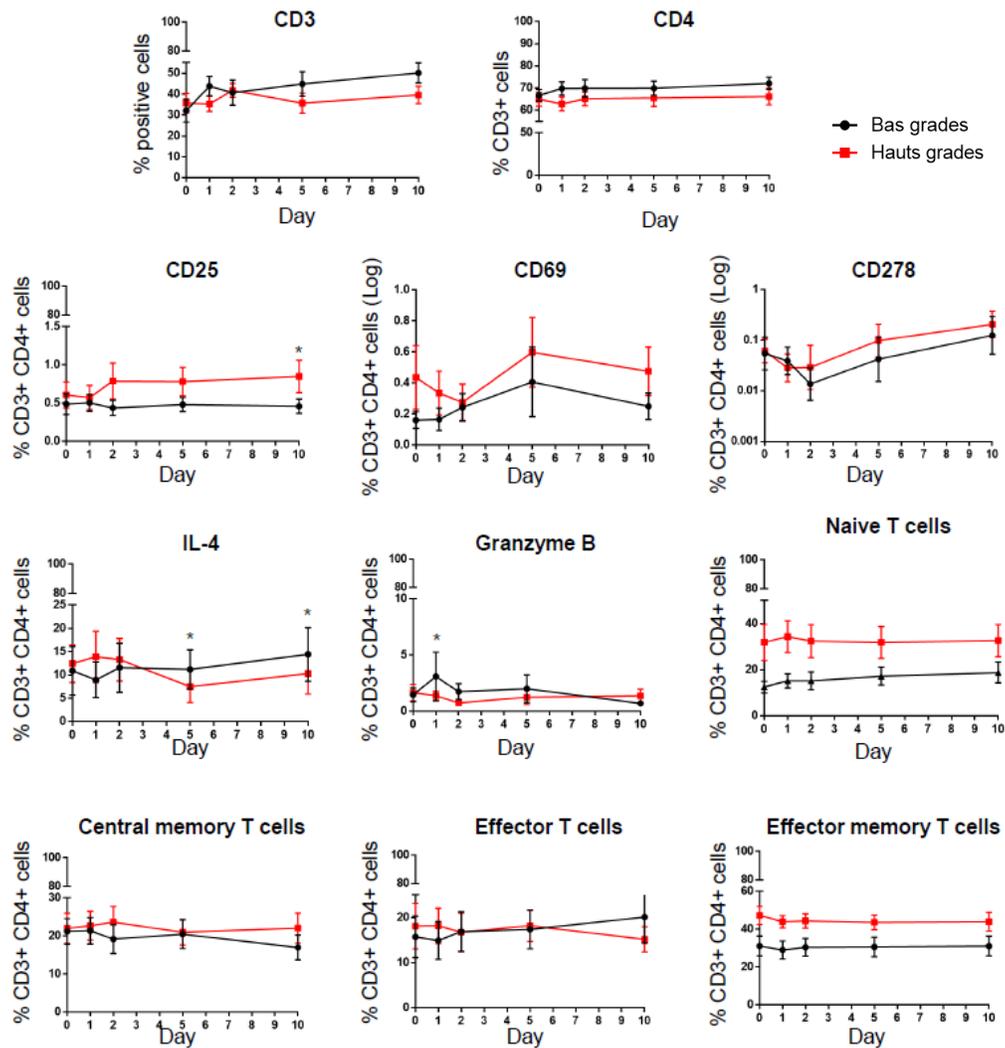
SOURIS HSA	PATIENTS HSA
↗ IL-6	↗ Facteurs inflammatoires de mauvais pronostics (IFN- γ , bFGF, MCP-4, Flt-1)
↘ IL-10	↗ Cellules myéloïdes du sang
↗ Neutrophiles sanguins	↗ Macrophages totaux du sang
↗ Monocytes pro-inflammatoires, microglie activée et l'ensemble des macrophages du cerveau	↗ Monocytes classiques et intermédiaires
↗ Activation des astrocytes	↗ Cellules dendritiques
↗ Mort neuronale	

Tableau 10. Récapitulatif des différences entre le modèle murin HSA et les patients HSA.

1.2. Les patients HSA de haut grade possèdent un profil inflammatoire plus persistant que les patients bas grade.

Après avoir analysé l'évolution globale des cellules immunitaires dans notre cohorte de patients en fonction du temps et des DS, nous avons voulu savoir si cette évolution dépendait du grade des patients. Nous avons donc étudié l'évolution du pourcentage des cellules immunitaires dans le sang des patients HSA de notre cohorte en fonction de leur grade après les avoir dichotomisés en BG et HG. Pour commencer, il n'y a pas de différence significative quant à l'évolution du pourcentage des LT CD3⁺ en fonction du grade des patients HSA au cours du temps. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HG en comparaison avec les patients BG concernant le pourcentage des LT CD4⁺. Nous constatons que les patients HG ont une expression du marqueur CD25⁺ par les LT CD4⁺ significativement supérieure à J10 en comparaison avec les patients BG. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HG en comparaison avec les patients BG concernant l'expression du marqueur CD69 par les LT CD4⁺. Le niveau d'expression du marqueur CD278 chez les LT CD4⁺ évolue significativement différemment dans le temps en fonction du grade des patients. Cette expression est supérieure chez les patients HG à partir de J2 et le reste jusqu'à J10. Nous notons que l'évolution du profil de sécrétion de l'IL-4 par les LT CD4⁺ est significativement différente en fonction du grade des patients. De plus, à J5 et J10, cette sécrétion est significativement supérieure chez les patients BG en comparaison avec les patients HG. La sécrétion du granzyme B par les LT CD4⁺ est significativement supérieure à J1 chez les patients BG par rapport aux patient HG. Cependant, l'évolution de ce profil de sécrétion au cours du temps n'est pas statistiquement différente en fonction du grade des patients. Le pourcentage LT CD4⁺ naïfs est significativement supérieur chez les patients HG en comparaison avec les patients BG. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HG en comparaison avec les patients BG concernant les LT CD4⁺ mémoires centraux et effecteurs. Le pourcentage de LT CD4⁺ effecteurs mémoires chez les patients HG est significativement supérieur à celui des patients BG au cours du temps (Fig.27).

Figure 27. Évolution des LT CD4⁺ en fonction du grade des patients HSA.



Légende Fig.27. Comparaison de l'évolution des LT CD4⁺ des patients HSA en fonction de leurs grades. Cette figure présente les résultats obtenus durant l'analyse de cytométrie en flux des PBMC du sang des patients HSA (panels 1 à 3). Les cellules CD3⁺ proviennent d'une sélection initiale selon la morphologie excluant les doublets et les cellules mortes grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité cellulaire. La courbe noire représente la moyenne des pourcentages des cellules obtenus chez les patients HSA BG de notre cohorte (n=8) et la courbe rouge représente la moyenne des pourcentages obtenus chez les patients HG de notre cohorte (n=16). Afin d'alléger le contenu, seules les valeurs des résultats statistiquement significatifs seront présentées dans cette section.

L'expression du marqueur CD25 au cours du temps chez les LT CD3⁺CD4⁺ est significativement supérieur chez les patient HG en comparaison avec les patients BG à J10 (p*=0,02).

L'expression du marqueur CD278 chez les LT CD3⁺CD4⁺ est significativement différente au cours du temps chez les patients HG en comparaison avec les patients BG (p*=0,01).

Le profil de sécrétion au cours du temps de l'IL-4 chez les LT CD3⁺CD4⁺ est significativement différent en fonction du grade des patients (p*=0,04). Ce niveau de sécrétion est significativement supérieur chez les patients BG à J5 (p*=0,03) et J10 (p*=0,03) en comparaison avec les patients HG.

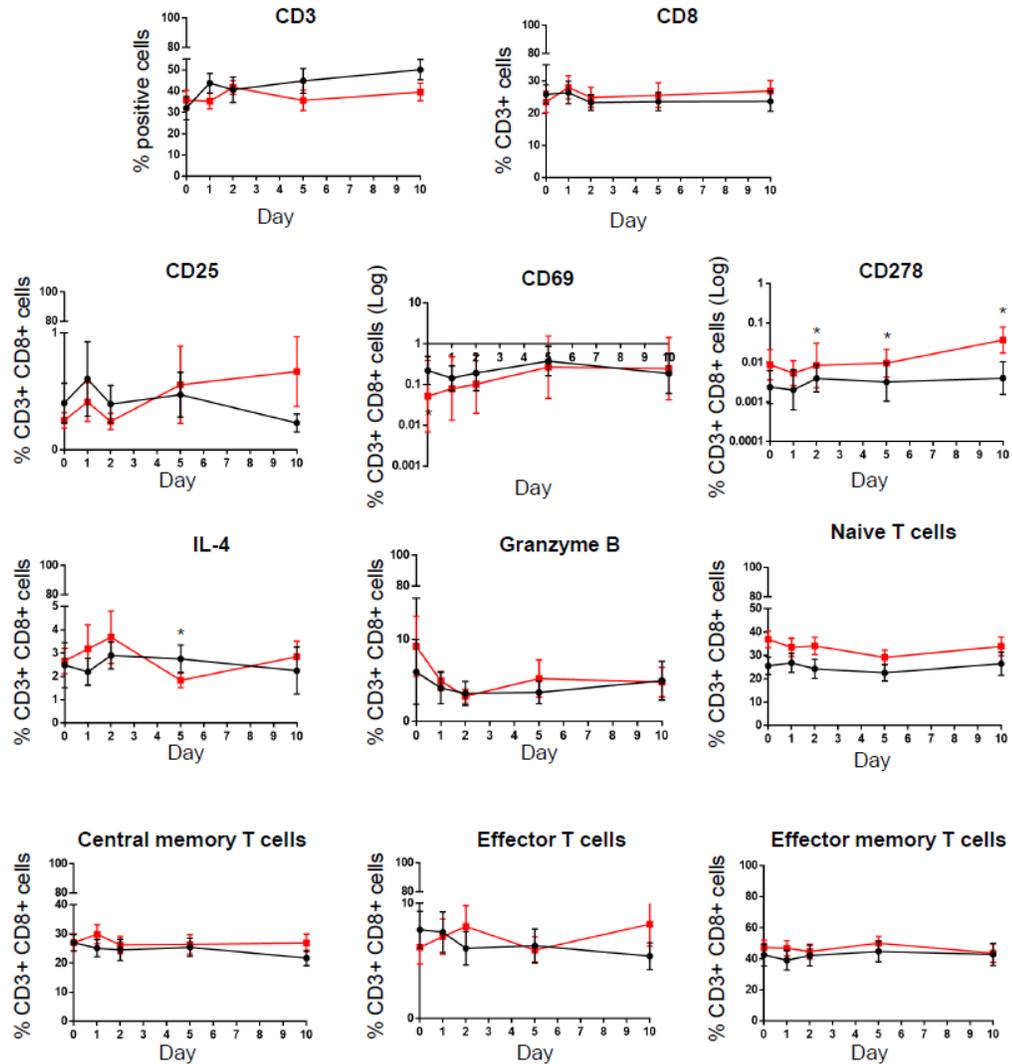
Le profil de sécrétion au cours du temps du granzyme B par les LT CD3⁺CD4⁺ est significativement supérieur chez les patients BG en comparaison avec les patients HG à J1 (p*=0,03).

Le pourcentage de LT naïfs (cellules CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺) est significativement supérieur chez les patients HG par rapport aux patients BG au cours du temps (p*=0,04).

Le pourcentage de LT effecteurs mémoires (cellules CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD62L⁻) est significativement supérieur chez les patients HG par rapport aux patients BG au cours du temps (p*=0,03).

Le pourcentage de LT CD8⁺ chez les patients HG est significativement supérieur à celui des patients BG au cours du temps. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HG en comparaison avec les patients BG concernant les marqueurs d'activation CD25 et CD69 des LT CD8⁺. Cependant, le niveau d'expression du marqueur CD278 par les LT CD8⁺ est significativement supérieur chez les patients HG en comparaison avec les patients BG à J2, J5 et J10. Nous remarquons que le profil de sécrétion de l'IL-4 par les LT CD8⁺ a une évolution significativement différente au cours du temps selon le grade des patients HSA et que cette sécrétion est significativement supérieure chez les patients BG à J5. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HG en comparaison avec les patients BG concernant le profil de sécrétion du granzyme B. Le pourcentage de LT CD8⁺ naïfs est significativement supérieur chez les patients HG en comparaison avec les patients BG au cours du temps. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HG en comparaison avec les patients BG concernant le pourcentage de LT CD8⁺ mémoires centraux, les LT CD8⁺ effecteurs et les LT CD8⁺ effecteurs mémoires (Fig.28).

Figure 28. Évolution des LT CD8⁺ en fonction du grade des patients HSA.



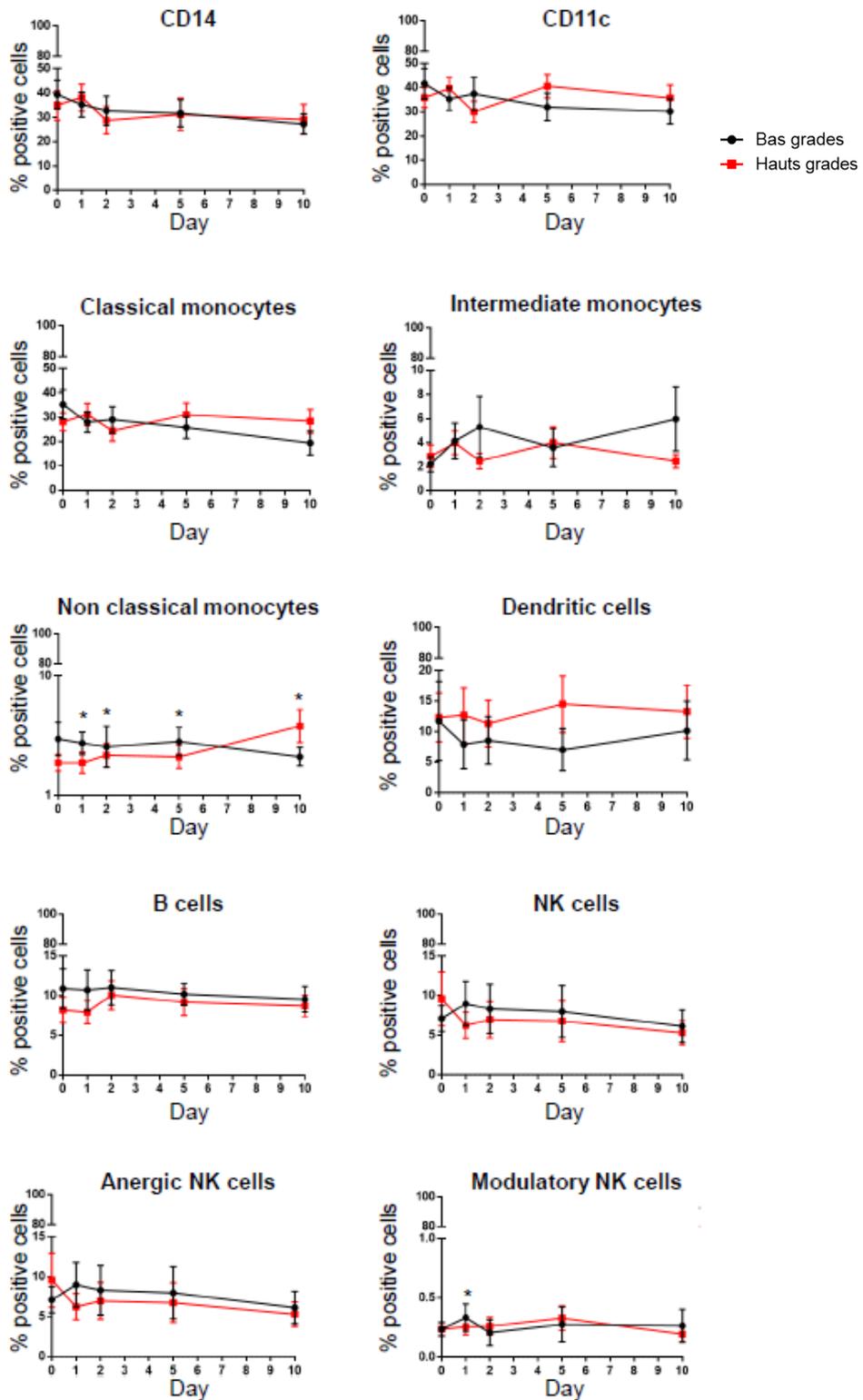
Légende Fig.28. Comparaison de l'évolution des LT CD8⁺ des patients HSA en fonction de leurs grades. Cette figure présente les résultats obtenus durant l'analyse de cytométrie en flux des PBMC du sang des patients HSA (panels 1 à 3). Les cellules CD3⁺ proviennent d'une sélection initiale selon la morphologie excluant les doublets et les cellules mortes grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité cellulaire. La courbe noire représente la moyenne des pourcentages des cellules obtenus chez les patients HSA BG de notre cohorte (n=8) et la courbe rouge représente la moyenne des pourcentages obtenus chez les patients HG de notre cohorte (n=16). Afin d'alléger le contenu, seules les valeurs des résultats statistiquement significatifs seront présentées dans cette section.

Le pourcentage des LT CD3⁺CD8⁺ est significativement supérieur chez les patients HG en comparaison avec les patients BG (p*=0,04).

L'expression du marqueur CD278 par les LT CD3⁺CD8⁺ est significativement supérieur chez les patients HG à J2 (p*=0,03), J5 (p*=0,04) et J10 (p*=0,02) en comparaison avec les patients BG. L'évolution du niveau de sécrétion de l'IL-4 au cours du temps par les LT CD3⁺CD8⁺ est significativement différente selon le grade des patients (p*=0,03). Cette sécrétion est significativement supérieure chez les patients BG à J5 en comparaison avec les patients HG (p*=0,049). Le pourcentage des LT naïfs (cellules CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺) est significativement supérieur chez les patients HG par rapport aux patients BG au cours du temps (p*=0,004).

Pour l'analyse des cellules immunitaires innées, nous constatons une évolution significativement différente des monocytes totaux en fonction du grade des patients. Le pourcentage des cellules myéloïdes du sang évolue également significativement différemment en fonction du temps et du grade des patients. Nous notons un pourcentage de ces cellules myéloïdes supérieur chez les patients HG aux temps tardifs (J5 et J10) en comparaison avec les patients BG. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HG en comparaison avec les patients BG au cours du temps concernant les monocytes classiques. Les pourcentages des monocytes intermédiaires ont une évolution significativement différente en fonction des grades et ces pourcentages sont supérieurs à tous les temps pour les patients BG en comparaison avec les patients HG. Le pourcentage de monocytes non classiques est significativement supérieur chez les patients BG de J1 à J5 et significativement supérieurs chez les patients HG 10j après le diagnostic. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les patients HG en comparaison avec les patients BG au cours du temps concernant les DC et les LB. Les pourcentages des cellules NK et des cellules NK anergiques ont une évolution significativement différente en fonction du grade des patients et ces deux types cellulaires ont des pourcentages supérieurs chez les patients BG de J1 à J10. Le pourcentage des cellules NK modulateurs est significativement supérieur chez les patients BG à J1 en comparaison aux patients HG (Fig.29).

Figure 29. Évolution des autres leucocytes en fonction du grade des patients HSA.



Légende Fig.29. Comparaison de l'évolution des cellules immunitaires innées et des LB des patients HSA en fonction de leurs grades. Cette figure présente les résultats obtenus durant l'analyse de cytométrie en flux des PBMC du sang des patients HSA (panels 4 à 6). Les cellules CD14⁺ proviennent d'une sélection initiale selon la morphologie excluant les doublets et les cellules mortes grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité cellulaire. La courbe noire représente la moyenne des pourcentages des cellules obtenus chez les patients HSA BG de notre cohorte (n=8) et la courbe rouge représente la moyenne des pourcentages obtenus chez les patients HG de notre cohorte (n=16). Afin d'alléger le contenu, seules les valeurs des résultats statistiquement significatifs seront présentées dans cette section.

Les pourcentages de l'ensemble des monocytes totaux et des macrophages (cellules CD14⁺) évoluent significativement différemment en fonction du grade des patients au cours du temps (p*=0,002).

Les pourcentage des cellules myéloïdes du sang (cellules CD11c⁺) évoluent significativement différemment en fonction du grade des patients au cours du temps (p*=0,03).

Le pourcentage des monocytes intermédiaires (cellules CD11c⁺CD14^{high}CD16⁺) évolue significativement différemment en fonction du grade des patients au cours du temps (p*=0,04).

Le pourcentage des monocytes non classiques (cellules CD11c⁺CD14^{low}CD16^{high}) est significativement supérieur chez les patients BG à J1 (p*=0,009), J2 (p*=0,04) et J5 (p*=0,03) et significativement supérieur chez les patients HG à J10 (p*=0,03).

Les pourcentages des cellules NK (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁺CD16⁺) évoluent significativement différemment en fonction du grade des patients au cours du temps (p*=0,01).

Les pourcentages des cellules NK anergiques (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁻CD16⁺) évoluent significativement différemment en fonction du grade des patients au cours du temps (p*=0,01).

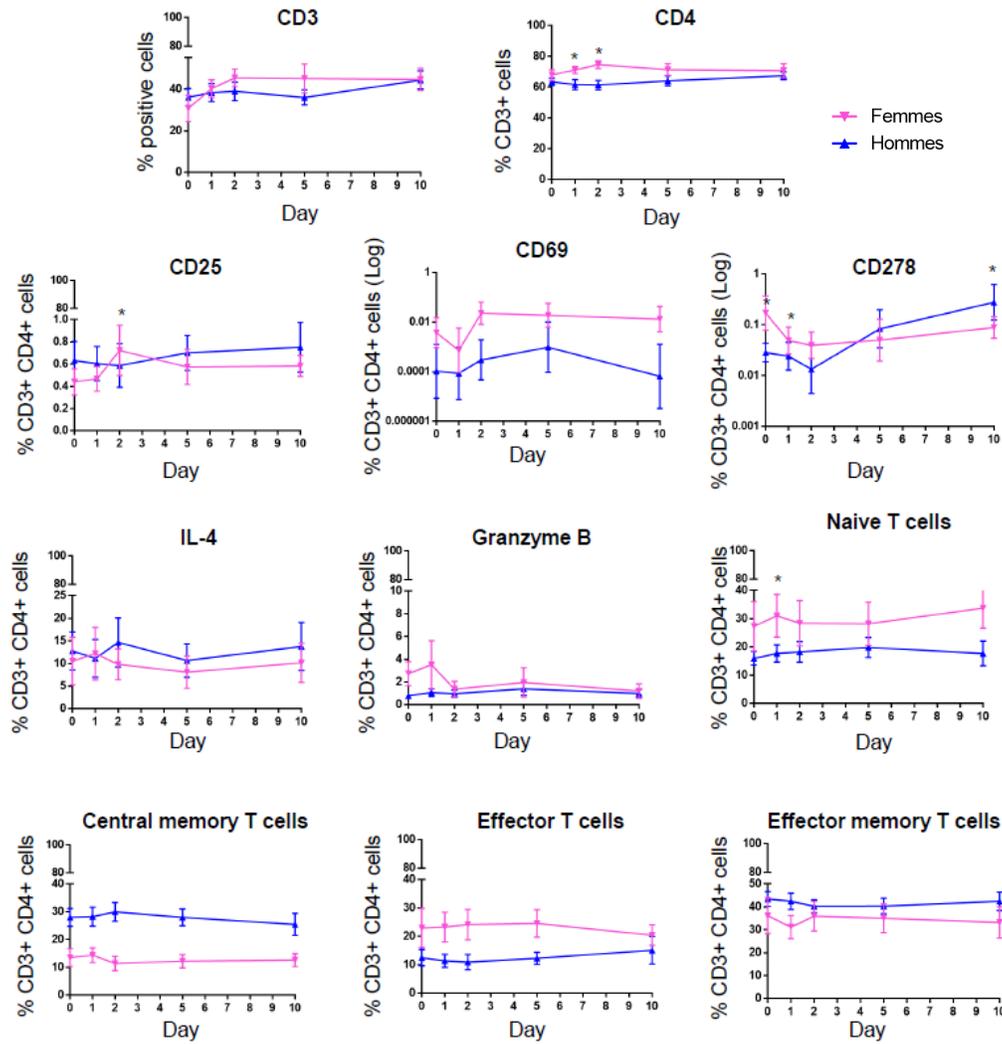
Le pourcentage de cellules NK modulateurs (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁺CD16⁻) est significativement supérieur chez les patients BG en comparaison avec les patients HG à J1 (p*=0,03).

Finalement, ces résultats suggèrent que l'état inflammatoire des patients HG n'est pas systématiquement plus élevé aux temps précoces par rapport aux patients BG, mais que cet état inflammatoire est maintenu dans le temps chez les patients HG.

1.3. Les patients HSA de sexe masculin ont un profil inflammatoire plus marqué que celui des femmes.

Dans cette dernière analyse, nous avons comparé l'évolution des cellules immunitaires au cours du temps en fonction du sexe des patients. Les LT (cellules CD3⁺) montrent une évolution significativement différente dans le temps en fonction du sexe des patients avec un pourcentage plus élevé chez les femmes à partir de J2. Le pourcentage des LT CD4⁺ chez les femmes est significativement supérieur à celui des hommes au cours du temps. D'ailleurs, les femmes possèdent significativement plus de LT CD4⁺ que les hommes à J1 et J2. En ce qui concerne l'activation de ces cellules, le niveau d'expression du marqueur CD25 par les LT CD4⁺ est significativement supérieur à J2 chez les femmes. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les hommes en comparaison avec les femmes au cours du temps concernant l'expression du marqueur CD69 par les LT CD4⁺. L'expression du marqueur CD278 par les LT CD4⁺ évolue significativement différemment chez les patients en fonction de leur genre. Nous constatons que l'expression de ce marqueur est significativement supérieure chez les femmes à J0 et J1 puis significativement supérieure chez les hommes à J10. Concernant le profil de sécrétion cytokinique des LT CD4⁺, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les hommes en comparaison avec les femmes au cours du temps pour l'IL-4 et le granzyme B. Les LT CD4⁺ naïfs ont un pourcentage significativement supérieur à J1 chez les femmes en comparaison avec les hommes. Le pourcentage des LT CD4⁺ mémoires centraux est significativement supérieur dans le temps chez les hommes en comparaison avec les femmes. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les hommes en comparaison avec les femmes au cours du temps pour les LT CD4⁺ effecteurs et effecteurs mémoires (Fig.30).

Figure 30. Évolution des LT CD4⁺ en fonction du genre des patients HSA.



Légende Fig.30. Comparaison de l'évolution des LT CD4⁺ en fonction du sexe des patients. Cette figure présente les résultats obtenus durant l'analyse de cytométrie en flux des PBMC du sang des patients HSA (panels 1 à 3). Les cellules CD3⁺ proviennent d'une sélection initiale selon la morphologie excluant les doublets et les cellules mortes grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité cellulaire. La courbe rose représente la moyenne des pourcentages des cellules obtenus chez les femmes (n=11) et la courbe bleue représente la moyenne des pourcentages obtenus chez hommes de notre cohorte (n=13). Afin d'alléger le contenu, seules les valeurs des résultats statistiquement significatifs seront présentées dans cette section. Les pourcentages des LT CD3⁺ évoluent significativement différemment au cours du temps en fonction du sexe des patients HSA (p*=0,03).

Les pourcentages des LT CD3⁺CD4⁺ sont significativement supérieurs chez les femmes en comparaison avec les hommes au cours du temps (p*=0,02). Le pourcentage des LT CD3⁺CD4⁺ est significativement supérieur chez les femmes à J1 (p*=0,01) et J2 (p*=0,04) en comparaison avec les hommes.

L'expression du marqueur CD25 par les LT CD3⁺CD4⁺ est significativement supérieur chez les femmes à J2 (p*=0,02) en comparaison avec les hommes.

L'expression du marqueur CD278 par les LT CD3⁺CD4⁺ au cours du temps est significativement différent selon le sexe des patients (p*=0,03). Cette expression est significativement supérieure chez les femmes à J0 (p*=0,001) et J1 (p*=0,02) et significativement supérieure chez les hommes à J10 (p*=0,005).

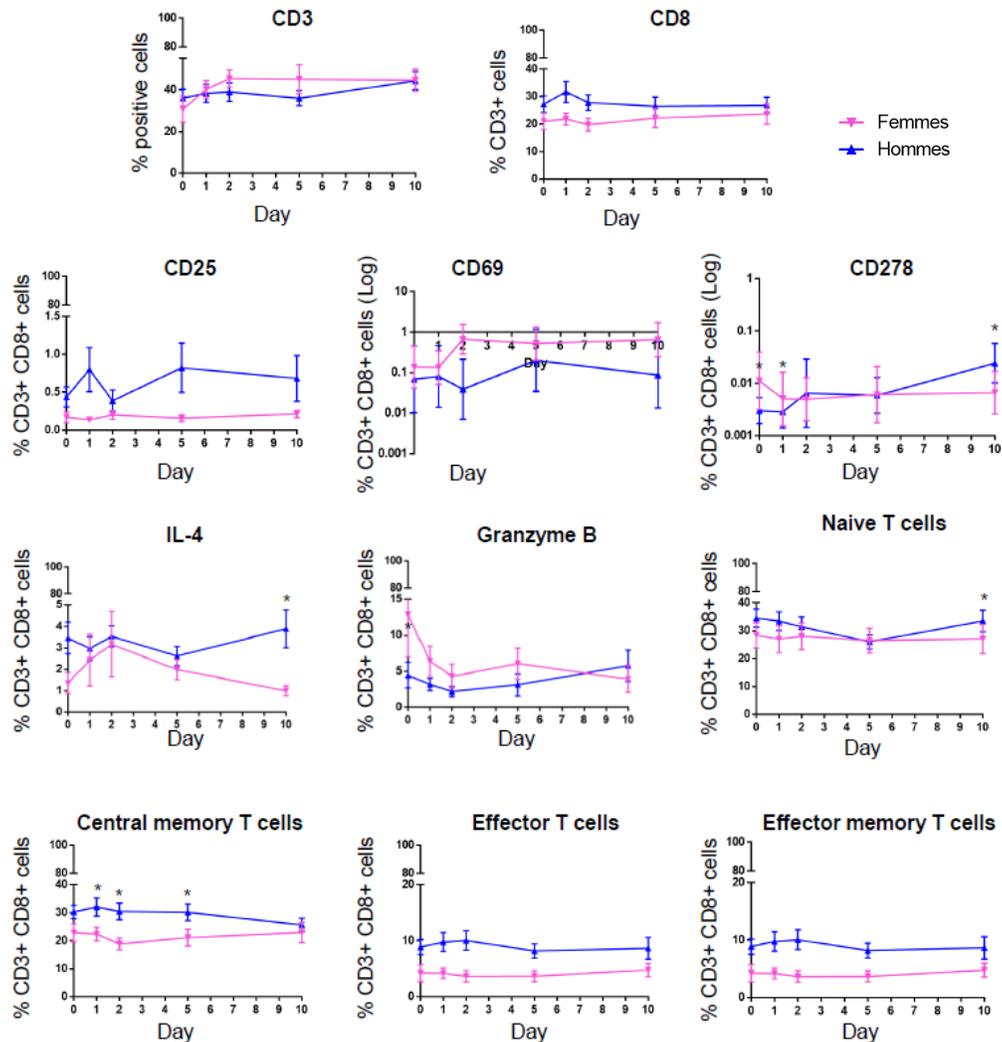
Le pourcentage des LT naïfs (cellules CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁺) est significativement supérieur chez les femmes à J1 en comparaison avec les hommes (p*=0,049).

Le pourcentage de LT mémoires centraux (cellules CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD62L⁻) est significativement supérieur chez les hommes au cours du temps en comparaison avec les femmes (p*=0,001).

Pour les LT CD8⁺, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les hommes en comparaison avec les femmes au cours du temps. Pour ce qui est du profil d'activation des LT CD8⁺, nous remarquons que le niveau d'expression du marqueur CD25 chez les hommes est significativement supérieur par rapport aux femmes au cours du temps. Le niveau d'expression du marqueur CD69 chez les LT CD8⁺ est significativement supérieur chez les femmes par rapport aux hommes au cours du temps. Finalement, le niveau d'expression du marqueur CD278 chez les LT CD8⁺ évolue significativement différemment au cours du temps chez les patients en fonction de leur genre. Ce niveau d'expression est significativement supérieur chez les femmes à J0 et J1 et significativement supérieur chez les hommes à J10. En ce qui concerne le profil de sécrétion des LT CD8⁺, nous constatons que la sécrétion de l'IL-4 est significativement supérieure chez les hommes par rapport aux femmes au cours du temps. Cette dernière est significativement supérieure à J10 chez les hommes. La sécrétion du granzyme B par les LT CD8⁺ est significativement supérieure chez les femmes à J0. Le pourcentage de LT CD8⁺ naïfs est significativement supérieur chez les hommes à J10 par rapport aux femmes. Le pourcentage de LT CD8⁺ mémoires centraux est significativement supérieure chez les hommes par rapport aux

femmes au cours du temps. De plus, ce pourcentage est significativement supérieur chez les hommes à J1, J2 et J5. Le pourcentage de LT CD8⁺ effecteurs est significativement supérieur chez les hommes en comparaison avec les femmes au cours du temps. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les hommes en comparaison avec les femmes au cours du temps pour les LT CD8⁺ effecteurs mémoires (Fig.31).

Figure 31. Évolution des LT CD8⁺ en fonction du genre des patients HSA.



Légende Fig.31. Comparaison de l'évolution des LT CD8⁺ en fonction du sexe des patients. Cette figure présente les résultats obtenus durant l'analyse de cytométrie en flux des PBMC du sang des patients HSA (panels 1 à 3). Les cellules CD3⁺ proviennent d'une sélection initiale selon la

morphologie excluant les doublets et les cellules mortes grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité cellulaire. La courbe rose représente la moyenne des pourcentages des cellules obtenus chez les femmes (n=11) et la courbe bleue représente la moyenne des pourcentages obtenus chez hommes de notre cohorte (n=13). Afin d'alléger le contenu, seules les valeurs des résultats statistiquement significatifs seront présentées dans cette section.

L'expression du marqueur CD25 par les LT CD3⁺CD8⁺ est significativement supérieure chez les hommes en fonction des femmes au cours du temps (p*=0,03).

L'expression du marqueur CD69 par les LT CD3⁺CD8⁺ est significativement supérieure chez les femmes en fonction des hommes au cours du temps (p*=0,01).

L'expression du marqueur CD278 par les LT CD3⁺CD8⁺ évolue significativement différemment chez les hommes en fonction des femmes au cours du temps (p*=0,02). Ce niveau d'expression est significativement supérieur chez les femmes à J0 (p*=0,03) et J1 (p*=0,02) puis significativement supérieur chez les hommes à J10 (p*=0,01).

Le niveau de sécrétion de l'IL-4 par les LT CD3⁺CD8⁺ est significativement supérieur chez les hommes par rapport aux femmes au cours du temps (p*=0,03). Ce niveau d'expression est significativement supérieur à J10 chez les hommes (p*=0,008).

Le niveau de sécrétion du granzyme B par les LT CD3⁺CD8⁺ évolue significativement différemment au cours du temps en fonction du sexe (p*=0,03).

Le pourcentage des LT naïfs (cellules CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁺) est significativement supérieur chez les hommes à J2 par rapport aux femmes (p*=0,04).

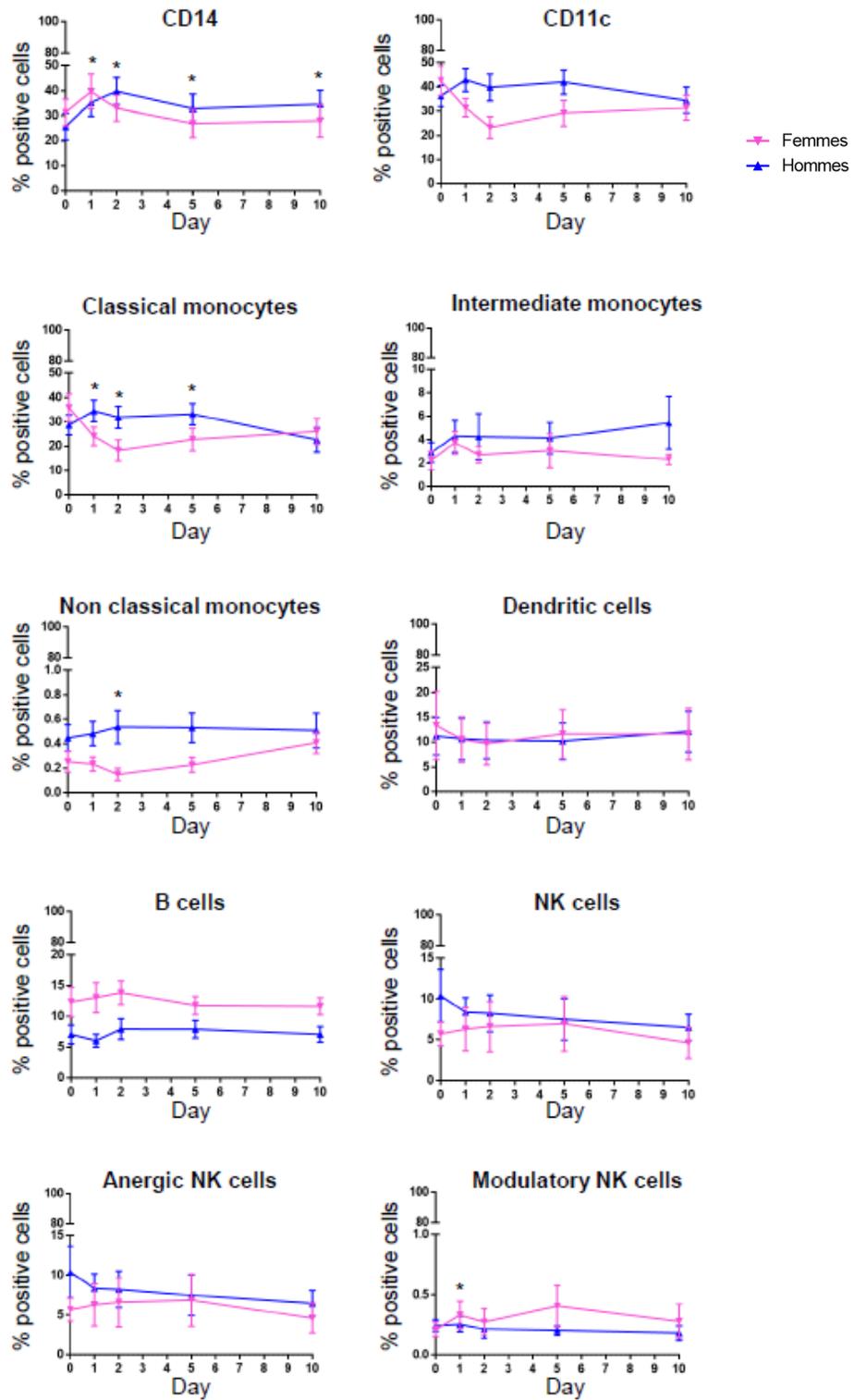
Les pourcentages des LT mémoires centraux (cellules CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD62L⁻) sont significativement supérieurs chez les hommes au cours du temps en comparaison avec les femmes (p*=0,03). Ces pourcentages sont significativement supérieurs à J1 (p*=0,01), J2 (p*=0,03) et J5 (p*=0,02) chez les hommes.

Les pourcentages des LT effecteurs (cellules CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD62L⁺) sont significativement supérieurs chez les hommes au cours de temps par rapport aux femmes (p*=0,001).

Pour les cellules immunitaires innées, la proportion de l'ensemble des monocytes totaux et des macrophages est définie par une évolution significativement différente au cours du temps en fonction du sexe des patients. Les pourcentages des monocytes totaux sont significativement supérieurs chez les femmes à J1 puis significativement supérieurs chez les hommes à J2, J5 et J10. Les cellules myéloïdes du sang sont associées à une évolution significativement différente au cours du temps en fonction du sexe des patients. Les monocytes classiques évoluent

significativement différemment au cours du temps en fonction du sexe des patients. Ils sont caractérisés par des pourcentages significativement supérieurs chez les hommes entre J1 et J5. Les monocytes intermédiaires sont significativement supérieurs chez les hommes par rapport aux femmes au cours du temps. De plus, le pourcentage des monocytes non classiques est significativement supérieur chez les hommes au cours du temps par rapport aux femmes. Le pourcentage des monocytes non classiques est significativement supérieur chez les hommes à J2 par rapport aux femmes. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les valeurs obtenues chez les hommes en comparaison avec les femmes concernant les DC. Les pourcentages de LB au cours du temps sont significativement supérieurs chez les femmes par rapport aux hommes. Pour finir, les pourcentages des cellules NK et des cellules NK anergiques sont significativement supérieurs chez les hommes au cours du temps. Le pourcentage des cellules NK modulateurs est significativement supérieur chez les femmes à J1 (Fig.32).

Figure 32. Évolution des autres leucocytes en fonction du genre des patients HSA.



Légende Fig.32. Comparaison de l'évolution des cellules immunitaires innées et des LB en fonction du sexe des patients. Cette figure présente les résultats obtenus durant l'analyse de cytométrie en flux des PBMC du sang des patients HSA (panels 4 à 6). Les cellules CD14⁺ proviennent d'une sélection initiale selon la morphologie excluant les doublets et les cellules mortes grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité cellulaire. La courbe rose représente la moyenne des pourcentages des cellules obtenus chez les femmes (n=11) et la courbe bleue représente la moyenne des pourcentages obtenus chez hommes de notre cohorte (n=13). Afin d'alléger le contenu, seules les valeurs des résultats statistiquement significatifs seront présentées dans cette section.

Les pourcentages de l'ensemble des monocytes totaux et des macrophages (cellules CD14⁺) ont une évolution significativement différente au cours du temps selon le sexe des patients HSA (p*=0,001). Le pourcentage de ces cellules CD14⁺ est significativement supérieur chez les femmes à J1 (p*=0,02), puis significativement supérieur chez les hommes à J2 (p*=0,04), J5 (p*=0,02) et J10 (p*=0,003).

Les pourcentages des cellules myéloïdes du sang (cellules CD11c⁺) ont une évolution significativement différente au cours du temps selon le sexe des patients HSA (p*=0,001).

Les pourcentages des monocytes classiques (cellules CD11c⁺CD14^{high}CD16⁻) évoluent significativement différemment au cours du temps selon le sexe des patients HSA (p*=0,0001). Les pourcentages des monocytes classiques sont significativement supérieurs chez les hommes à J1 (p*=0,0007), J2 (p*=0,0007) et J5 (p*=0,03).

Les pourcentages des monocytes intermédiaires (cellules CD11c⁺CD14^{high}CD16⁺) évoluent significativement différemment au cours du temps en fonction du sexe des patients HSA (p*=0,007).

Les pourcentages des monocytes non classiques (cellules CD11c⁺CD14^{low}CD16^{high}) évoluent significativement différemment au cours du temps en fonction du sexe des patients HSA (p*=0,02). Le pourcentage des monocytes non classiques est significativement supérieur chez les hommes à J2 (p*=0,04).

Les pourcentages des LB (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁻CD19⁺CD20⁺) sont significativement supérieurs chez les femmes au cours du temps par rapport aux hommes (p*=0,02).

Les pourcentages des cellules NK (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁺CD16⁺) sont significativement supérieurs chez les hommes par rapport aux femmes au cours du temps (p*=0,007).

Les pourcentages des cellules NK anergiques (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁻CD16⁺) sont significativement supérieurs chez les hommes par rapport aux femmes au cours du temps (p*=0,007).

Les pourcentages des cellules NK modulateurs (cellules CD3⁻CD14⁻CD56⁺CD16⁻) ont une évolution significativement différente au cours du temps selon le sexe des patients HSA (p*=0,04). Le pourcentage des cellules NK modulateurs est significativement supérieur chez les femmes à J2

($p^*=0,04$).

En conclusion, cette étude nous a permis de comparer l'évolution des cellules immunitaires sanguines au cours du temps, en comparaison avec les DS et en fonction du genre ou du grade des patients HSA. Les proportions supérieures et soutenues dans le temps de l'ensemble des monocytes totaux et des macrophages, des cellules myéloïdes du sang, des monocytes classiques, intermédiaires et non classiques ainsi que des cellules NK et des cellules NK anergiques chez les hommes montrent donc que les hommes ont un état inflammatoire plus élevé que les femmes dans notre cohorte de patients HSA.

2. Étude *in vitro* de l'impact inflammatoire du sérum et du LCR de patients HSA.

Dans cette dernière étude, nous avons évalué *in vitro* la capacité d'induction inflammatoire des échantillons de patients HSA. Nous avons sélectionné une lignée cellulaire de microglie (HMC3), car dans notre modèle animal, ce type cellulaire semblait essentiel au maintien d'un terrain inflammatoire élevé à la suite de l'induction de l'HSA. Nous avons choisi d'évaluer la capacité de production de ROS et de la phagocytose, deux marqueurs de l'état d'activation des macrophages et de la microglie. Pour la microglie, une condition hautement inflammatoire (M1-like) est associée à l'augmentation de la production de ROS et à la diminution de la capacité de phagocytose. Au contraire, une activation M2-like est associée à la diminution de la production de ROS et à l'augmentation de la capacité de phagocytose (297). Le but de ces expériences est donc d'évaluer l'état inflammatoire de la microglie en réponse à l'application de sérum (n=24) ou de LCR (n=17) de patients HSA, ce qui reflètera l'état inflammatoire des patients eux-mêmes.

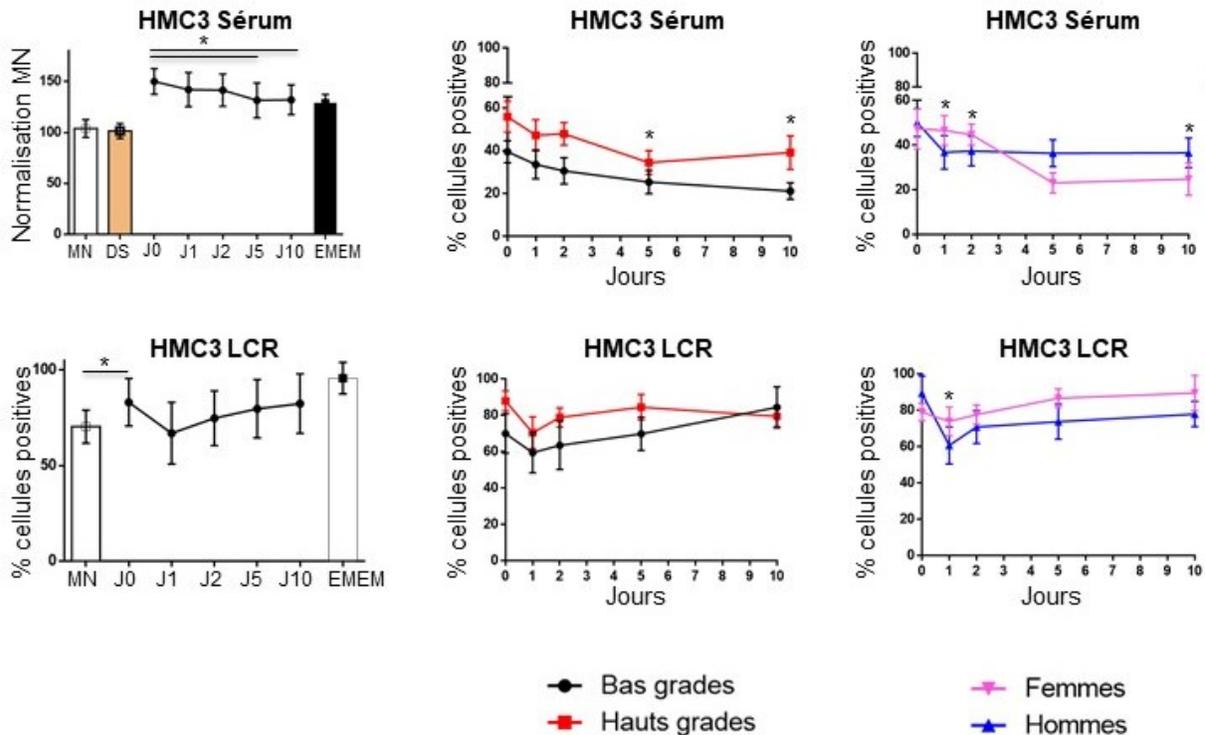
En premier lieu, nous avons évalué la capacité de production de ROS de la microglie après 24h de stimulation avec du sérum ou du LCR de patients. Pour cette expérience, nous avons deux contrôles. Le premier est le contrôle négatif, dans lequel on laisse les cellules dans leur MN pour évaluer leur capacité basale de production de ROS. Le second contrôle est un contrôle positif, les cellules sont stimulées avec du milieu sans sérum (EMEM) qui est connu pour créer une situation de stress et donc d'augmentation de la production de ROS par la microglie. Nous avons également vérifié que l'application de MN était similaire à celle de l'application de sérum de DS confirmant le niveau basal de production de ROS par cette lignée cellulaire.

À la suite de l'application de sérum de patients sur notre lignée cellulaire, lorsque l'on regarde tous les patients ensemble, nous remarquons l'augmentation significative de la capacité de production de ROS à tous les temps étudiés par rapport à la condition contrôle (MN) et à celle de l'application de sérum de DS. D'ailleurs, cette capacité de production de ROS est tellement augmentée qu'elle dépasse celle de notre contrôle positif (EMEM) pour tous les temps étudiés. Afin de mieux visualiser les variations dans cette situation, nous avons décidé de normaliser les résultats au contrôle négatif (MN). Lors de l'analyse selon le temps, nous remarquons une diminution significative de la production de ROS à J5 et J10 en comparaison à

J0. Par la suite, nous avons voulu savoir si cette capacité de production de ROS était identique en fonction du grade des patients. L'application de sérum de patients HG est associée à une production de ROS significativement supérieure à celle secondaire à l'application de sérum de patients BG pour tous les temps étudiés. L'analyse en fonction du temps nous indique une capacité de production de ROS significativement supérieure chez les patients HG par rapport aux BG à J5 et J10. En ce qui concerne l'analyse des genres, nous observons une évolution significativement différente de la capacité de production de ROS en fonction du sexe des patients. L'analyse par temps indique qu'aux temps précoces (J1 et J2), l'application de sérum des patients de sexe féminin est liée à une capacité de production de ROS par la microglie supérieure à celle des hommes. Nous notons que cette forte capacité de production de ROS chez les femmes n'est pas maintenue dans le temps, car elle est fortement diminuée à J5 et J10. Au contraire, les hommes ont un niveau de production de ROS qui se maintient et devient significativement supérieur à celui des femmes à J10 (Fig.33).

Lorsque nous appliquons du LCR de patients HSA sur notre lignée cellulaire de microglie, nous observons également une augmentation significative de la capacité générale de la production de ROS par rapport au MN au cours du temps. Cependant, cette capacité de production de ROS reste inférieure à celle de notre contrôle positif (EMEM). L'analyse par temps nous indique une augmentation significative de la production de ROS à J0 en comparaison avec le MN. L'analyse en fonction du grade des patients révèle une évolution significativement différente dans le temps en fonction du grade des patients. Toutefois, l'analyse en fonction du temps n'a pas fait ressortir un temps où la différence était significative entre les deux groupes. Pour l'analyse en fonction du genre des patients, l'évolution dans le temps est significativement différente en fonction du sexe des patients. La capacité de production de ROS des femmes est supérieure à celles des hommes pour tous les temps étudiés. De plus, nous constatons qu'à J1, la production de ROS est significativement supérieure chez les femmes en comparaison aux hommes (Fig.33).

Figure 33. Évaluation de la capacité de production de ROS.



Légende Fig.33. Évaluation de la capacité de production de ROS du sérum et du LCR de patients sur la lignée cellulaire HMC3. Cette figure présente les résultats obtenus durant l'analyse de cytométrie en flux de la lignée cellulaire HMC3. Les cellules proviennent d'une sélection initiale selon la morphologie excluant les doublets et les cellules mortes grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité cellulaire. Afin d'alléger le contenu, seules les valeurs des résultats statistiquement significatifs seront présentées dans cette section. La lecture de la figure se fait de gauche vers la droite, une ligne après l'autre.

La capacité de production de ROS secondaire à l'application de sérum de patients HSA (n=24) est significativement supérieure à la capacité de production de ROS secondaire à l'application de MN ($p^*=0,0005$) et à l'application de sérum de DS (n=5, $p^*=0,0005$). Le pourcentage de cellules produisant des ROS est significativement supérieur à la suite de l'application de sérum de patients HG en comparaison à l'application de sérum BG à J5 ($p^*=0,0041$) et J10 ($p^*=0,0001$) en comparaison avec J0.

La capacité de production de ROS secondaire à l'application de sérum de patients HSA est significativement supérieure à la suite de l'application de sérum de patients HG en comparaison avec les patients BG ($p^*=0,001$). Le pourcentage de cellules produisant des ROS est significativement supérieur à la suite de l'application de sérum de patients HG en comparaison à l'application de sérum

de patients BG à J5 ($p^*=0,01$) et J10 ($p^*=0,004$).

L'évolution de la capacité de production de ROS à la suite de l'application de sérum de patients HSA est statistiquement différente selon le sexe des patients ($p^*=0,0005$). Le pourcentage de cellules produisant des ROS est significativement supérieur à la suite de l'application de sérum de femmes à J1 ($p^*=0,048$) et J2 ($p^*=0,04$) puis significativement supérieur à la suite de l'application de sérum d'hommes à J10 ($p^*=0,01$).

La capacité de production de ROS secondaire à l'application de LCR de patients HSA ($n=17$) est significativement supérieure à la capacité de production de ROS secondaire à l'application de MN ($p^*=0,03$). Le pourcentage de cellules produisant des ROS est significativement supérieur à la suite de l'application de LCR de patients en comparaison à l'application du MN à J1 ($p^*=0,03$).

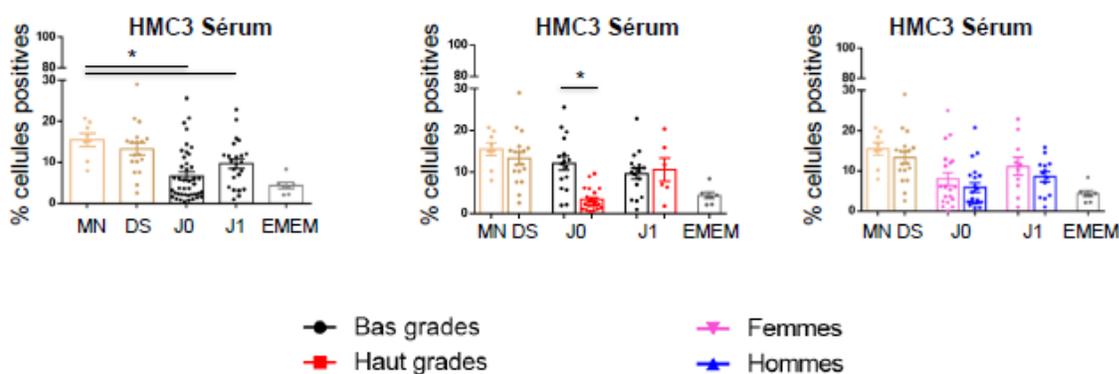
L'évolution de la capacité de production de ROS à la suite de l'application de LCR de patients HSA est significativement différente selon le grade des patients ($p^*=0,04$).

L'évolution de la capacité de production de ROS à la suite de l'application de LCR de patients HSA est significativement différente selon le sexe des patients ($p^*=0,01$). Le pourcentage de cellules produisant des ROS est significativement supérieur à la suite de l'application de LCR de femmes en comparaison à l'application d'hommes à J1 ($p^*=0,02$).

Pour la deuxième expérience d'évaluation de la capacité de phagocytose, les contrôles sont les mêmes. Le MN nous permet d'évaluer la capacité de phagocytose de la microglie en condition normale. La stimulation sans sérum (EMEM) nous permet d'évaluer la capacité de phagocytose en condition hautement inflammatoire. À titre d'indication, nous avons évalué la capacité de phagocytose secondaire à l'application de sérum des DS ($n=5$). Les capacités de phagocytose secondaire à l'application de MN et des DS sont très similaires ce qui confirme que notre contrôle MN est très proche d'une condition normale. La capacité de phagocytose est significativement diminuée à la suite de la stimulation par notre contrôle positif EMEM en comparant aux conditions MN et DS. Pour cette expérience, nous avons testé les sérums de patients HSA à deux temps J0 et J1. Dans une première étude, nous avons regardé l'effet de l'application de tous les sérums de patients sur la capacité de phagocytose. L'application des sérums à J0 et J1 diminue significativement la capacité de phagocytose de la microglie par rapport au MN et aux DS. Cette capacité de phagocytose semble augmenter à J1, mais cette augmentation n'est pas significative. Cependant, la différence de la capacité de phagocytose entre la condition EMEM et J1 est significative alors que celle entre EMEM et J0 ne l'est pas,

ce qui laisse penser que le profil inflammatoire est plus marqué à J0 qu'à J1 pour tous les patients HSA. Dans une deuxième étude, nous avons étudié l'impact de l'application de sérum de patients sur la capacité de phagocytose en fonction du grade des patients. L'application des sérums de patients BG est associée à une capacité de phagocytose par la microglie significativement supérieure à celle des sérums de patients HG à J0. D'ailleurs, les différences de capacité de phagocytose entre les conditions MN et les sérums de patients BG ainsi qu'entre les sérums de DS et les sérums de patients BG ne sont pas significatives alors qu'elles le sont avec les sérums de patients HG à J0. À J1, cette différence de capacité de phagocytose est perdue entre les grades. Pour ce qui est de l'analyse des genres, même si la capacité de phagocytose est significativement diminuée à J0 et J1 quel que soit le sexe des patients, il n'existe pas de différence significative dans la capacité à induire la phagocytose sur notre lignée cellulaire (Fig.34).

Figure 34. Évaluation de la capacité de phagocytose.



Légende Fig.34. Évaluation de la capacité de phagocytose du sérum de patients sur la lignée cellulaire HMC3. Cette figure présente les résultats obtenus durant l'analyse de cytométrie en flux de la lignée cellulaire HMC3. Les cellules proviennent d'une sélection initiale selon la morphologie excluant les doublets et les cellules mortes grâce à l'utilisation d'un marqueur de viabilité cellulaire. Afin d'alléger le contenu, seules les valeurs des résultats statistiquement significatifs seront présentées dans cette section.

Le pourcentage de cellules capables de phagocytose est significativement inférieur à la suite de l'application de sérum de patient HSA (n=24) à J0 ($p^*0,0004$) et J1 ($p^*=0,0153$) en comparaison à la capacité de phagocytose à la suite de l'application de MN. Le pourcentage de cellules capables de phagocytose est significativement inférieur à la suite de l'application de sérum de patient HSA à J0

($p^*=0,0004$) et J1 ($p^*=0,0013$) en comparaison à la capacité de phagocytose à la suite de l'application de sérum de DS. Le pourcentage de cellules capables de phagocytose est significativement inférieur à la suite de l'application de sérum de patient HSA à J1 ($p^*=0,002$) en comparaison à la capacité de phagocytose à la suite de l'application de EMEM.

Le pourcentage de cellules capables de phagocytose est significativement supérieur à la suite de l'application de sérum de patients BG à J0 ($p^*=0,007$) en comparaison à la capacité de phagocytose à la suite de l'application d'EMEM. Le pourcentage de cellules capables de phagocytose est significativement supérieur à la suite de l'application de sérum de patients BG à J0 ($p^*=0,0001$) en comparaison à la capacité de phagocytose à la suite de l'application de sérum de patients HG. Ce pourcentage de cellules capables de phagocytose est significativement inférieur à la suite de l'application de sérum de patients HG à J0 en comparaison à la capacité de phagocytose à la suite de l'application de MN ($p^*=0,0001$) et du sérum de DS ($n=5$, $p^*=0,0001$).

Le pourcentage de cellules capables de phagocytose est significativement supérieur à la suite de l'application de sérum de patients BG à J1 ($p^*=0,02$) en comparaison à la capacité de phagocytose à la suite de l'application d'EMEM. Le pourcentage de cellules capables de phagocytose est significativement supérieur à la suite de l'application de sérum de patients HG à J1 ($p^*=0,04$) en comparaison à la capacité de phagocytose à la suite de l'application d'EMEM.

Le pourcentage de cellules capables de phagocytose est significativement inférieur à la suite de l'application de sérum de femmes à J0 en comparaison à la capacité de phagocytose à la suite de l'application de MN ($p^*=0,01$) et du sérum de DS ($p^*=0,02$). Le pourcentage de cellules capables de phagocytose est significativement inférieur à la suite de l'application de sérum d'hommes à J0 en comparaison à la capacité de phagocytose à la suite de l'application de MN ($p^*=0,0001$) et du sérum de DS ($p^*=0,0003$).

Le pourcentage de cellules capables de phagocytose est significativement supérieur à la suite de l'application du sérum de femmes ($p^*=0,03$) et d'hommes ($p^*=0,03$) à J1 en comparaison à la capacité de phagocytose à la suite de l'application d'EMEM. Le pourcentage de cellules capables de phagocytose est significativement supérieur à la suite de l'application de sérum d'hommes à J1 en comparaison à la capacité de phagocytose à la suite de l'application de MN ($p^*=0,003$) et des DS ($p^*=0,03$).

Pour finir, ces résultats vont dans le sens d'une augmentation précoce de l'inflammation cérébrale et systémique chez les patients HSA. Ces résultats confirment également que les patients HG ont une inflammation supérieure à tous les temps et donc plus difficilement

régulable. De plus, ces expériences valident que le sexe masculin est associé à un profil inflammatoire maintenu dans le temps à la suite d'une HSA

Discussion

Dans une première étude, nous avons développé et défini un modèle murin d'HSA représentatif de la clinique des patients. À cet effet, nous avons caractérisé la nature du processus inflammatoire et décrit les marqueurs immunologiques impliqués. Ainsi, nous avons montré que l'induction de l'HSA est caractérisée par la diminution précoce de l'IL-10, de même que par l'augmentation précoce de l'IL-6 et prolongée des neutrophiles périphériques. En d'autres termes, ces variations reflètent l'activation de l'inflammation systémique. Cette inflammation systémique est liée à l'augmentation du recrutement précoce des neutrophiles et des monocytes pro-inflammatoires dans le cerveau. Nous avons également constaté l'augmentation de l'ensemble des macrophages et de la microglie activée du cerveau au cours de la période des EBI. Finalement, grâce aux analyses d'immunofluorescence, nous avons remarqué que l'induction de l'HSA est responsable de l'activation d'une importante inflammation locale. Cette dernière est caractérisée par l'augmentation de l'activation de la microglie et des astrocytes 7j après l'induction de l'HSA. En définitive, l'augmentation de l'inflammation systémique et locale précède l'apparition de la mort neuronale et de déficits moteurs dans notre modèle d'HSA.

Le choix du modèle animal est une étape importante dans la préparation d'un projet de recherche. Ce modèle doit être le plus comparable possible de la condition à étudier pour générer des résultats extrapolables à l'humain. Il existe actuellement différents types de modèles animaux pour l'étude de l'HSA. Certaines études ont été faites sur des modèles de singes, mais nécessitaient l'extraction d'une artère intracérébrale, une méthode chirurgicale invasive (298, 299). Les chiens (300, 301), les chats (302) et les cochons (303) ont également été utilisés dans l'HSA. Dans certains cas, l'induction de l'HSA nécessitait une craniotomie et l'installation chirurgicale d'un cathéter, une méthode chirurgicale très invasive (237). Ces modèles, même s'ils ont l'avantage d'être sur des organismes de grande taille, viennent avec les problèmes d'espèces de ce gabarit. En effet, les coûts associés à la chirurgie et la gestion quotidienne de ces grandes espèces sont plus importants. D'autant plus que ces espèces animales demandent beaucoup de temps et d'entretien pendant les chirurgies et les différentes expérimentations. En principe, il existe trois méthodes d'induction de l'HSA. La première implique la perforation d'une artère intra-crâniale au niveau de la base du crâne (304). Ce modèle à l'avantage de

reproduire des HSA sévères, mais l'absence de contrôle de la quantité de sang déversée dans le cerveau cause une importante mortalité (305). Il génère également une longue période d'ischémie qui risque d'influencer les résultats obtenus et donc, la conclusion même de ces études (237). La deuxième méthode d'induction de l'HSA consiste à prélever du sang artériel et le laisser coaguler en dehors de l'organisme. Il est ensuite placé chirurgicalement dans l'adventice d'une artère intracrânienne (306, 307). Cette méthode est dispendieuse par son processus de chirurgie et difficilement reproductible. Il est important de noter que ces deux premières méthodes ont été développées pour l'étude du vasospasme. Elles ne permettent aucunement l'étude des voies moléculaires impliquées dans la physiopathologie de l'HSA (285, 308). À la lumière de ce qui a été évoqué dans l'introduction, le vasospasme a longtemps constitué le sujet principal des études visant à diminuer la gravité des HSA. Cependant, sa diminution pharmaceutique n'a pas démontré de bénéfices nets dans les modèles animaux ou chez les patients (243, 284, 309). C'est pour ces raisons que nous avons choisi d'utiliser la troisième méthode d'induction de l'HSA par l'injection directe de sang artériel dans la citerne pré-chiasmatique (285). Ce modèle est comparable à la rupture d'un anévrisme de la circulation antérieure, la localisation la plus fréquente des anévrismes. Il a le mérite d'être adapté aux études moléculaires et est communément utilisé pour les études des EBI. Les avantages de notre modèle sont sa simplicité, les coûts peu élevés du principe de chirurgie et le faible taux de mortalité en comparaison aux modèles préexistants. De plus, avec le volume contrôlé de sang injecté, nous assurons le contrôle de la gravité de l'HSA induite et donc la reproductibilité de ce modèle (310). Au contraire de beaucoup d'études sur les HSA qui se concentrent uniquement sur les EBI (24-48h) (282, 311, 312) ou sur les DCI (10j ou plus) (292, 313), ce modèle permet l'observation de la progression de la maladie au cours du temps. Par conséquent, cette méthode nous a permis de suivre l'évolution des cellules immunitaires à des temps similaires de notre étude réalisée avec les patients (314, 315). Ceci augmente la puissance de nos résultats et la comparabilité entre notre modèle murin et les patients HSA. Afin de respecter la plus grande rigueur scientifique possible, la personne qui effectuait les tests moteurs était différente de celle qui faisait les chirurgies, et les souris étaient assignées à des groupes de manière aléatoire (316). Concernant le contrôle, nous avons choisi comme contrôle des témoins SHAM qui subissaient la chirurgie sans injection de sang. La comparaison entre les souris aillant reçu une injection de sang ou de saline a déjà été réalisée par un ancien étudiant dans le laboratoire. Cette étude a

montré une neutrophilie, une augmentation de la mort neuronale et une augmentation de l'activation de la microglie chez les souris HSA. Les résultats de nos deux études étant similaires, nous pensons que les effets que nous observons chez les souris HSA sont bien la conséquence de la présence du sang dans l'espace sous-arachnoïdien et non celle de l'augmentation de la PIC.

L'HSA est associée à des complications systémiques complexes (317). Pour vérifier la qualité de notre modèle, nous avons regardé si nous étions capables de retrouver l'activation inflammatoire systémique. Nous avons observé une augmentation de l'IL-6 dans notre modèle HSA. Cette cytokine est connue pour jouer un rôle dans l'apparition de la neuro-inflammation et des déficits fonctionnels faisant suite à une insulte cérébrale (318). La diminution de l'IL-10 est en accord avec ses fonctions anti-inflammatoires (319). Les valeurs de ces cytokines, même si elles paraissent petites, sont semblables aux ordres de grandeur des valeurs attendues dans des souris C57BL/6J WT (294, 295). Contrairement à d'autres études, nous n'avons pas été en mesure de remarquer de variation pour le TNF- α et l'IL-1 β dans notre modèle (320, 321).

L'HSA est responsable de l'augmentation de la perméabilité de la BHE ce qui facilite l'infiltration des leucocytes dans le cerveau (322). L'infiltration des monocytes et des neutrophiles dans le cerveau est donc la conséquence de la rupture de la BHE secondaire à la sécrétion de cytokines et d'autres facteurs inflammatoires par les cellules environnantes comme la microglie, les astrocytes et les leucocytes (323). L'importante infiltration des neutrophiles dans le cerveau concorde avec l'augmentation des neutrophiles périphériques observée dans notre modèle de souris HSA. En effet, pour faciliter la migration et l'entrée des neutrophiles dans le cerveau, il faut que l'organisme augmente leur production et leur mobilisation. Ce phénomène est visible dans notre modèle par l'augmentation significative du nombre de neutrophiles circulants à tous les temps étudiés et par la neutrophilie importante dans le cerveau aux temps précoces (de 12h à 48h) en réponse à l'induction de l'HSA. Les neutrophiles sont connus pour leur grande capacité de phagocytose. Ils ne sont pas endogènes du cerveau donc leur présence révèle l'activation de l'inflammation cérébrale (324). Initialement, les neutrophiles et les monocytes circulants entrent dans l'espace sous-arachnoïdien pour nettoyer les débris résultants du saignement comme les globules rouges (325). Le blocage du flux du LCR causé par la présence du thrombus piège les phagocytes activés dans l'espace sous-

arachnoïdien. Les neutrophiles piégés et activés entrent en dégranulation et libèrent des facteurs pro-inflammatoires (326). Cette sécrétion accrue a pour conséquence d'amplifier l'inflammation locale (129) et de favoriser l'apparition des dommages cérébraux. La présence élevée des neutrophiles dans le LCR des patients HSA est un facteur prédictif du vasospasme (327) et leur déplétion dans un modèle murin d'HSA diminue la fréquence de ce dernier (328). Néanmoins, l'effet de leur déplétion dans un modèle d'HSA n'a pas suffi à diminuer la gravité des symptômes associés à cette maladie (322). Ces résultats nous laissent donc penser que malgré le rôle des neutrophiles dans la boucle d'amplification de l'inflammation locale, ils ne constituent pas une cible unique suffisante dans la diminution de l'apparition des dommages cérébraux et des symptômes secondaires à l'HSA.

À vrai dire, les HSA sont des événements catastrophiques et l'inflammation cérébrale est de plus en plus considérée comme étant responsable de la sévérité de cette pathologie. La microglie est la principale population cellulaire représentant l'immunité innée dans le cerveau. Elle est en partie composée des macrophages résidents (329). Ces macrophages sont capables de se polariser en fonction des signaux perçus dans le microenvironnement. Comme déjà précisé dans ce manuscrit, le phénotype de la microglie varie d'un profil M1-like pro-inflammatoire à un profil M2-like anti-inflammatoire (230). L'orientation vers un sous-type pro- ou anti-inflammatoire peut également venir de la différenciation des monocytes infiltrants en fonction des signaux environnants (70). Nos résultats indiquent que l'induction de l'HSA est associée à l'augmentation significative des monocytes pro-inflammatoires à 24h et 48h dans le cerveau, mais pas dans le sang. Cette augmentation des monocytes pro-inflammatoires est la conséquence de la diminution significative des monocytes anti-inflammatoires dans le cerveau 12h après l'induction de l'HSA. Ces résultats attestent que les monocytes sont activés et différenciés localement dans le cerveau en réponse aux HSA. De plus, l'activation de la microglie a été évaluée par deux méthodes. La méthode de cytométrie en flux a révélé une augmentation significative de la microglie activée à 24h et 48h post-HSA. Celle-ci corroborait avec la diminution significative de la microglie résidente (non activée) 12h après l'induction de l'HSA. La technique d'immunofluorescence nous a permis d'évaluer l'activation de la microglie et des astrocytes par la quantification des pixels positifs des marquages Iba-1 (microglie) et GFAP (astrocytes). Nous avons décrit l'augmentation significative de l'activation de ces deux types

cellulaires 7j après l'induction de l'HSA. L'augmentation de l'inflammation locale par l'activation prolongée de ces deux types cellulaires a déjà été observée dans d'autres modèles dont ceux des lésions de la moelle épinière (330) ou des maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson (331) et d'Alzheimer (332). L'une des difficultés dans la compréhension de l'activation des astrocytes et de la microglie est l'identification du type cellulaire initiateur. En effet, il existe actuellement deux théories. La première selon laquelle les astrocytes conditionnent l'activation de la microglie (333). À l'inverse, la seconde considère que la microglie est responsable du conditionnement de l'activation des astrocytes (334). En réalité, l'astrogliose et l'activation de la microglie ont été notées depuis longtemps dans le cas des HSA (335). Pourtant elles ont longtemps été mises de côté et certains auteurs considèrent qu'il existe une lacune dans leur connaissance (336). Dans un modèle murin d'HSA par injection intracérébrale de sang autologue (semblable à notre modèle), la déplétion de la microglie par l'utilisation de liposomes a été associée à la diminution du vasospasme et de la mort neuronale précoce (324). Cependant, cette étude n'a pas analysé l'impact à long terme et l'effet potentiel de cette déplétion sur le développement des symptômes. La microglie est connue pour détenir un rôle pivot dans la neuro-inflammation (337, 338). Le parallèle entre la séquence d'activation de cette microglie et l'apparition de la mort neuronale dans l'HSA a d'ailleurs déjà été constaté (339). De plus, il est connu que l'activation inflammatoire de la microglie favorise la phagocytose des neurones vivants (340, 341) et que son inhibition est suffisante pour prévenir la mort neuronale inflammatoire *in vitro* (342). Toutes ces connaissances ont permis l'émergence de nouvelles études orientées vers la quête de nouvelles stratégies de modulation du phénotype microglial vers un profil anti-inflammatoire dans des modèles de lésions cérébrales traumatiques (343), d'accidents vasculaires cérébraux (344) ou d'ischémies cérébrales (345). Dans ces trois études, l'orientation de la différenciation de la microglie et des macrophages vers un sous-type M2 est liée à la diminution de l'inflammation cérébrale et à un effet neuroprotecteur. En effet, la microglie M2-like détient un pouvoir protecteur contre les insultes neuronales et dans la promotion de la réparation tissulaire (346). Néanmoins, une mauvaise régulation de son activation peut entraîner la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6 qui favorisent l'apparition de la mort et des dysfonctions neuronales (347). Dans l'ensemble, nous pensons que l'activation des astrocytes est une conséquence de l'activation de la microglie (348). Nous croyons également que l'activation de

l'inflammation cérébrale est subséquente à celle de macrophages (349) et des neutrophiles qui entrent dans l'espace sous-arachnoïdien pour activer et maintenir l'inflammation locale. L'exacerbation de cette inflammation favorise finalement la mort neuronale.

Effectivement, il est connu que l'HSA est responsable d'une importante mort neuronale précoce par apoptose, une conséquence directe du saignement intracérébral (234). Elle a été observée chez les humains (350) et dans différents modèles animaux (351). Basés sur cette littérature préexistante, nous avons décidé d'utiliser la caspase-3 clivée comme marqueur apoptotique. Cette dernière constitue la dernière caspase effectrice de la voie apoptotique. De ce fait, elle est considérée comme la plus représentative de l'activation de l'apoptose (352, 353). Dans notre première étude, nous avons non seulement validé la présence de l'apoptose neuronale précoce (24h après l'induction de l'HSA), mais nous avons également montré que cette mort neuronale dépendante de la caspase-3 persiste 7j après l'induction de l'HSA. Celle-ci concorde avec l'apparition des troubles moteurs déjà recensés dans différents modèles d'HSA (292, 351, 354). Certaines études semblent montrer que les conséquences de l'HSA seraient finalement dues à la mort cellulaire par nécrose (355). Malheureusement, les autres méthodes d'évaluation de la mort cellulaire que nous avons essayées (Fluorochrome B, TUNEL) n'ont pas permis de révéler d'autres types de morts cellulaires dans notre modèle. Il est probable que dans ces autres études, la nécrose secondaire due à une mauvaise clairance apoptotique ait été observée. En bref, ces résultats confirment non seulement que notre modèle est fonctionnel et qu'il reproduit ce qui est observé dans la littérature sur différents modèles d'HSA, mais aussi que la mort neuronale tardive concorde avec l'apparition des symptômes.

Nous avons conscience que les patients sont caractérisés par des pertes de fonctions cognitives, fonctionnelles et comportementales. Toutefois, pour assurer la reproductibilité des résultats, nous nous sommes concentrés sur l'étude des fonctions motrices qui étaient facilement quantifiables et de manière objective. Nous avons donc choisi de limiter notre étude à deux tests phénotypiques qui nous semblaient les plus représentatifs des symptômes observés à long terme chez les patients et connus dans la littérature pour être présents à la suite de l'induction de l'HSA dans les modèles animaux. Le *footprint test* est utilisé fréquemment pour la caractérisation des dysfonctions motrices (356). Le second test est une adaptation du test de la grille inversée qui est basé sur l'instinct des souris à éviter la chute dans le vide en s'accrochant. Ce test est

considéré comme un bon indicateur de la force musculaire (357). Grâce à ces derniers, nous avons montré que l'induction de l'HSA est liée à l'apparition de dysfonctions motrices et à la diminution de la force musculaire des souris. Ces résultats valident notre modèle et le fait qu'il reproduit des symptômes similaires à ceux des autres modèles et des patients (285, 288).

Dans le but de vérifier la comparabilité de notre modèle et de mieux caractériser l'inflammation systémique chez les patients, nous avons réalisé une étude prospective sur 13 patients HSA. Notre étude a révélé que certains facteurs de croissance, cytokines ou chimiokines possédaient une évolution significative au cours du temps en comparaison avec les DS. De plus, certains marqueurs semblent être des indicateurs de bon ou de mauvais devenir dans cette population de patients.

Le haut niveau d'IL-6 retrouvé dans notre modèle HSA et chez les patients étudiés corrèle avec l'implication de cette cytokine dans les insultes cérébrales (358, 359). Dans notre cohorte de patients, l'IL-6 a des niveaux qui augmentent au cours du temps chez les patients, mais ne semble pas être en lien avec la sévérité de la maladie. Au contraire, cette cytokine est connue dans la littérature pour être un facteur prédictif de mauvais pronostic et de l'apparition des DCI dans les HSA (360). En réalité, elle est considérée comme un marqueur prédictif du vasospasme (361) qui n'a pas été considéré dans notre étude, ce qui pourrait expliquer qu'elle n'y apparaisse pas comme un marqueur prédictif de mauvais pronostic.

Dans notre étude, l'IL-7 est caractérisée par une forte concentration qui augmente au cours du temps. Son niveau élevé chez les patients est signe de mauvais pronostic dans notre cohorte de patients. À notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir observé cette variation dans le cas des HSA. Pourtant cette protéine est considérée comme une cytokine pro-inflammatoire détenant un rôle central dans les régulations immunitaires (362). Elle est connue pour diminuer la capacité d'autophagie des macrophages et augmente le potentiel inflammatoire dans un modèle de pathologie hépatique (363). Son rôle dans l'inflammation est en accord avec sa présence accrue dans notre cohorte de patients.

Une autre cytokine caractérisée dans notre cohorte par sa forte concentration qui augmente au cours du temps est l'IL-16. Tout comme l'IL-7, il semblerait que cette protéine ne soit pas caractérisée dans le cas des HSA. Toutefois, l'IL-16 est une cytokine

immunomodulatrice qui régule la polarisation des macrophages M1. Elle est sécrétée pendant la polarisation des M1 et favorise la libération d'autres cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-1 β et l'IL-12. Sa présence dans le microenvironnement maintient la différenciation des macrophages vers un phénotype M1 (364). De plus, elle semble détenir un rôle crucial dans le SNC pour la réponse aux insultes cérébrales (365). Sa forte concentration reflèterait donc chez nos patients, l'activation de l'inflammation cérébrale et l'augmentation des M1.

Le SAA est caractérisé, dans notre étude, par un niveau élevé aux temps précoces diminuant au cours du temps pour passer en dessous de celui des DS à J10. C'est un marqueur sérique de la phase inflammatoire aigüe favorisant la production des cytokines pro-inflammatoires (366, 367). Dans notre étude, il ne semble pas être associé à un pouvoir prédictif du mauvais pronostic. Cependant, le SAA est connu pour avoir une valeur prédictive sur le développement d'infections nosocomiales chez les patients HSA durant leur hospitalisation (368). Sa présence accrue corrèle néanmoins avec l'important terrain inflammatoire secondaire aux HSA.

VCAM et ICAM sont des molécules d'adhésion appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Elles jouent en rôle dans la promotion de l'adhésion des leucocytes au niveau du site inflammatoire (369). L'augmentation de leur expression est connue dans différentes pathologies inflammatoires cérébrales (370, 371). Elles sont également impliquées dans la physiopathologie du vasospasme dans les études animales et humaines d'HSA (372, 373). De hauts taux de ces molécules dans le sérum et le LCR de patients sont considérés comme prédictifs de l'apparition des dommages cérébraux et systémiques (374). De plus, l'augmentation de la concentration d'ICAM-1 dans les 24 premières heures est liée à la sévérité des symptômes observés chez les patients HSA (375). Toutefois, ces observations ne sont pas validées dans notre étude. En effet, ICAM-1 semble associée à un pouvoir de prédiction du bon devenir des patients. VCAM a une expression qui diminue au cours du temps et qui reste toujours inférieure aux niveaux des DS. Une vérification sur un plus grand nombre de patients devra donc être envisagée pour confirmer ou non cette tendance.

L'IFN- γ est une cytokine pro-inflammatoire impliquée dans l'activation des monocytes et des macrophages (376). Dans notre étude, elle est caractérisée par une forte concentration dès le début qui augmente au cours du temps. Son augmentation dans le sang est associée à la

modification du comportement de la microglie, du fait de son impact sur la perméabilité de la BHE (377, 378). L'importante quantité de cet IFN- γ retrouvé dans le sérum des patients HSA de notre cohorte pourrait être un indicateur indirect de l'augmentation de la perméabilité de la BHE ainsi que de l'activation des monocytes et des macrophages pro-inflammatoires chez les patients HSA.

Le VEGF et le Flt-1 sont caractérisés par des taux supérieurs à ceux des DS dans notre étude. Dans la littérature, de hauts niveaux de Flt-1 (le récepteur au VEGF) et de VEGF à l'admission ont été associés à un mauvais pronostic chez les patients HSA. Ces facteurs sont en fait cruciaux pour le maintien de l'intégrité de la BHE. L'augmentation du niveau de VEGF est connue pour augmenter sa perméabilité (379). Des études sur des modèles murins d'HSA ont montré que le traitement par des anti-VEGF diminue la perméabilité de la BHE et la sévérité des symptômes associés (380, 381) confirmant ainsi l'importance du VEGF dans la perméabilisation de la BHE. Leurs hauts niveaux dans notre étude corréleront donc avec l'élévation de la perméabilité de la BHE en réponse à l'HSA. Cette forte concentration sérique de VEGF et Flt-1 est considérée comme la conséquence de leur libération depuis l'agrégation plaquettaire responsable de la formation du thrombus au niveau de la région ischémique cérébrale (382).

Le bFGF est un facteur de croissance connu pour stimuler l'angiogenèse et la réparation tissulaire en cas d'insulte cérébrale (383). Dans notre cohorte, il apparaît comme un marqueur de mauvais pronostic, car son niveau est toujours supérieur chez les patients avec un mauvais devenir en comparaison aux patients avec un meilleur pronostic. Cette différence est d'ailleurs très marquée 10j après le diagnostic. Selon la littérature, son action est bénéfique si elle est limitée aux 72 premières heures suivant l'insulte dans un modèle d'insultes cérébrales traumatiques sur des rats (384). Des taux élevés et prolongés dans le temps sont responsables de la fibrose, l'angiopathie et l'hyperplasie à des stades tardifs chez les patients HSA (385). Son importante présence à des temps tardifs chez les patients avec un mauvais devenir valide donc son implication dans des complications secondaires aux HSA.

L'IP-10 ou CXCL10 est une chimiokine pro-inflammatoire décrite pour son rôle inhibiteur sur l'angiogenèse et la promotion du recrutement et de l'activation des LT (386). De façon surprenante, dans notre étude elle est caractérisée par de faibles taux qui augmentent au

cours du temps, mais qui ne dépassent pas celui des DS. Son faible niveau a déjà été remarqué dans une étude sur des patients HSA (314). Cependant, elle semble impliquée dans la neuroprotection et le contrôle de l'inflammation dans des insultes ischémiques cérébrales (387, 388). De ce fait, nous pensons que sa faible concentration observée dans notre étude empêche son pouvoir protecteur et favorise l'inflammation.

Le MCP-1 est une chimiokine impliquée dans la migration des leucocytes, dont tout particulièrement les monocytes et les macrophages, au niveau du site inflammatoire (389). Dans l'HSA, elle est connue pour être augmentée dans le LCR et y est associée à un mauvais pronostic chez les patients (314). Dans les modèles animaux, son augmentation locale est impliquée dans la physiopathologie du vasospasme (390). De plus, chez les patients victimes d'accidents vasculaires cérébraux, son augmentation dans le sang est considérée comme un signe de la présence d'une importante inflammation cérébrale (391, 392). De ce fait, nous ne sommes pas étonnés de voir ce MCP-1 ressortir comme évoluant significativement différemment chez les patients HSA en comparaison avec les DS dans notre étude. De surcroît, l'expression de MCP-1 et d'IP-10 est directement induite par l'IL-6 dans le LCR des patients HSA (393). Dans notre étude, ces trois marqueurs sont apparus comme évoluant statistiquement différemment au cours du temps, ce qui confirme donc leur potentiel comme marqueurs prédictifs de l'évolution des patients.

Le MCP-4 est également une chimiokine impliquée dans la migration des leucocytes en cas de réponse inflammatoire (394). Cette famille de chimiokines est importante pour la migration des cellules immunitaires dans le SNC et est impliquée dans la rupture de la BHE (395). Des taux élevés de MCP-4 et de MCP-1 dans les insultes cérébrales traumatiques corrélaient avec un mauvais pronostic pour les patients (396, 397). Le MCP-4 entraîne la production de l'IP-10 (398), cette chimiokine pro-inflammatoire déjà décrite. À notre connaissance, c'est la première fois que le MCP-4 est associé à un potentiel prédictif de mauvais pronostic chez des patients HSA. Cependant, ces effets pro-inflammatoires connus vont dans le sens de nos observations.

L'IL-12 est une cytokine appartenant à la famille de l'IL-12 et est constituée de deux sous-unités p35 et p40. La sous-unité p40 que nous avons dosée permet la liaison avec les cytokines de la même famille (399). L'IL-12 est considérée comme une cytokine pro-

inflammatoire qui régule l'activité des macrophages et de la microglie en favorisant l'activation de la voie du NFκB (400). Dans notre cohorte, elle apparaît comme un facteur prédictif de bon pronostic. À notre connaissance, c'est la première fois que cette cytokine est identifiée comme possédant un pouvoir prédictif du devenir des patients. Cependant, des études semblent montrer que le rôle dans l'inflammation cérébrale de l'IL-12 a, jusqu'à récemment, été confondu avec celui de l'IL-23 qui est une cytokine hautement pro-inflammatoire et délétère dans ce contexte (401). Dans le cas des encéphalomyélites auto-immune expérimentale, le traitement précoce par l'IL-12 empêche le développement de la maladie chez les souris KO. De façon surprenante, cette suppression dépend de l'augmentation précoce de l'IFN-γ (402). De plus, l'IL-12p40 sécrétée en monomère ou homodimère inhibe les réponses inflammatoires induites par l'IL-12 ce qui pourrait expliquer sa nouvelle caractérisation comme un facteur bénéfique dans notre étude (403).

Le Tie-2 est une tyrosine kinase transmembranaire et le récepteur des angiopoïétines (404). L'augmentation des angiopoïétines et du Tie-2 dans un modèle d'HSA sur les rats est associée avec l'augmentation de l'angiogenèse dans le cerveau (405). Les angiopoïétines sont également considérées comme impliquées dans la récupération cérébrale par la diminution des œdèmes cérébraux, de l'inflammation et de la mort cellulaire en réponse aux hémorragies intracérébrales (406). Son augmentation dans le plasma de patients HSA a déjà été définie comme un signe de bon pronostic (407). Ces observations sont en accord avec nos résultats obtenus.

Pour finir, cette étude prospective sur les prélèvements sanguins de patients est très encourageante, car elle nous a permis de mettre en évidence de nouveaux marqueurs potentiels du devenir des patients HSA. De plus, nous remarquons que les facteurs qui évoluent significativement dans notre étude sont tous en relation avec le maintien d'un terrain inflammatoire, la différenciation des M1 ou la rupture de la BHE. Ces observations sont retrouvées dans notre modèle souris d'HSA dans lequel l'inflammation, l'augmentation de l'infiltration des leucocytes dont tout particulièrement des monocytes pro-inflammatoires précèdent l'apparition de la mort neuronale et des déficits moteurs. Néanmoins, certains marqueurs qui évoluent significativement dans notre étude semblent être en lien avec les DCI, le vasospasme ou le score clinique des patients dans d'autres études (408), des aspects que nous

n'avons pas considérés dans notre étude. Ces conclusions soulignent donc la nécessité d'études ultérieures se concentrant sur l'évolution des cellules immunitaires chez les patients au cours du temps.

Dans cette première étude, nous avons pour la première fois, montré que l'activation immunitaire précoce dans le cerveau précède la mort neuronale tardive et l'apparition de dysfonctions motrices à la suite de l'induction de l'HSA dans notre modèle murin. Ces résultats suggèrent une importante implication de l'inflammation, des cellules immunitaires dans les EBI faisant suite à l'induction de l'HSA. Ils vont dans le sens de notre hypothèse que l'inflammation, un phénomène multifactoriel, est à l'origine de la sévérité des HSA. En effet, nous pensons que la diminution de l'inflammation locale dans les HSA par la modulation de l'activation des astrocytes, de la microglie, de l'infiltration des neutrophiles et des monocytes pourrait améliorer le devenir des patients. La reprogrammation des macrophages constitue une opportunité thérapeutique non négligeable dans le développement de nouvelles thérapies. Les macrophages sont présents au niveau de la zone inflammée et jouent un grand rôle dans la régulation de l'inflammation par la sécrétion de différents facteurs. Le potentiel thérapeutique et l'effet neuroprotecteur associé à l'augmentation de la microglie M2-like ont déjà été évoqués dans la première partie de cette discussion (343-345). À ce sujet, notre laboratoire a précédemment montré que la protéine MFG-E8 favorise la reprogrammation des macrophages vers le sous-type M2 et qu'elle détient un fort pouvoir anti-inflammatoire (116, 286, 287). Notre second but de ce projet de doctorat était donc de réduire l'inflammation par la modulation du phénotype des macrophages et de la microglie par l'utilisation de la protéine MFG-E8 dans notre modèle murin d'HSA.

Dans une deuxième étude, nous avons testé l'effet du traitement par la protéine MFG-E8 dans notre modèle d'HSA. Nous avons constaté que l'administration de cette protéine par l'injection IP était liée à la diminution de l'inflammation systémique via la diminution du nombre de neutrophiles et de monocytes pro-inflammatoires circulants chez les souris HSA. Cette diminution se répercute à J7 localement par la diminution du ratio des marqueurs M1/M2, des astrocytes activés et de la mort neuronale. Finalement, l'atténuation de l'inflammation globale est liée à la diminution de la sévérité des symptômes observés chez les souris HSA traitées au MFG-E8.

Dans cette étude, la protéine MFG-E8 est associée à la diminution significative de l'IL-2 chez les souris HSA. L'IL-5, une cytokine spécifiquement sécrétée par les Th2 est également significativement diminuée chez les souris traitées au MFG-E8. Nous pensons que la diminution de ces deux cytokines reflète le rôle de la protéine MFG-E8 dans la présentation antigénique et la régulation de l'immunité adaptative par la diminution de l'activation des LT (409, 410). Mais aucune variation de ces cytokines n'a été observé chez les patients HSA. La diminution précoce des neutrophiles circulants pourrait être liée avec la diminution de l'infiltration des neutrophiles dans le cerveau. Malheureusement, les analyses de cytométrie en flux sur les cerveaux digérés à 24h et 48h n'ont pas été réalisées dans cette étude. Ce qui ne nous permet pas de confirmer directement l'hypothèse que cette protéine diminue l'infiltration cérébrale précoce des leucocytes dans notre modèle d'HSA. Cependant, la protéine MFG-E8 est connue pour son rôle sur la diminution de la migration et l'infiltration des neutrophiles dans des modèles *in vitro* (411). En effet, elle est capable de diminuer la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire en diminuant leur expression du *C-X-C Motif chemokine receptor 2* (CXCR 2), le récepteur à l'IL-8, dans un modèle murin de lésions pulmonaires aiguës (412). Nous pensons donc que la diminution des neutrophiles circulants dans notre modèle est représentative de la diminution de leur infiltration dans le cerveau, atténuant ainsi l'inflammation cérébrale secondaire à l'HSA. D'autre part, les diminutions des monocytes pro-inflammatoires circulants observée et du rapport des marqueurs M1/M2 dans le cerveau corroborent la capacité de la protéine MFG-E8 à favoriser la différenciation des monocytes et des macrophages vers un profil anti-inflammatoire (116, 286, 413). Ces résultats confirment donc le potentiel de cette protéine dans l'atténuation du profil pro-inflammatoire secondaire aux HSA.

Dans cette étude, nous avons également constaté que le traitement par la protéine MFG-E8 causait la diminution de l'activation des astrocytes et de la mort neuronale 7j après l'induction de l'HSA. La capacité de cette protéine à diminuer la mort neuronale est connue et semble une conséquence directe de la diminution de la neuro-inflammation (115, 353, 414). La protéine MFG-E8 est capable de diminuer les astrocytes A1 pro-inflammatoires et de favoriser leur différenciation vers un profil A2 anti-inflammatoire, dans des modèles *in vitro* de la maladie d'Alzheimer (215). L'augmentation du GFAP est considérée comme un marqueur de l'activation A1 des astrocytes (210). Ceci expliquerait que dans notre modèle, l'augmentation

des A β induite par le traitement avec la protéine MFG-E8 est perceptible par la diminution de la quantité du marquage GFAP. De plus, la diminution de cette inflammation cérébrale pourrait être liée avec la capacité de la protéine MFG-E8 à augmenter l'angiogenèse et donc à réparer la BHE (415-417). Même si le lien direct entre la protéine MFG-E8 et la diminution de la perméabilité de la BHE ne semble pas établi, il est probable que l'augmentation de l'angiogenèse ait un effet protecteur sur la rupture de la BHE en cas d'inflammation cérébrale.

Au sujet de la neuro-inflammation, le rôle de la protéine MFG-E8 dans la diminution de l'inflammation cérébrale est de plus en plus décrits. Cette protéine a été associée à une augmentation de l'activité neuroprotectrice de la microglie contre la mort neuronale induite par les dépôts A β (418). Dans le cas des ischémies cérébrales, elle détient un rôle protecteur car elle diminue l'activation de l'inflammasome (117) et promeut la prolifération et la migration des cellules souches dans un model murin (101). Dans le cas des HSA, cette protéine MFG-E8 diminue l'inflammation précoce secondaire aux HSA (353, 419). Ces études ont montré que l'injection directe dans les ventricules cérébraux de la protéine MFG-E8 est liée à la diminution de la mort neuronale précoce, du stress oxydatif et des déficits neurologiques 24h après l'induction de l'HSA. Cependant, ces études se concentraient uniquement sur les EBI et n'étudiaient pas son impact à long terme. De plus, ces études utilisaient le mode d'administration dans les ventricules cérébraux qui permet d'étudier directement l'effet de cette protéine dans le cerveau, mais empêche une extrapolation aux patients. En effet, il n'est pas possible d'envisager ce type d'administration dès l'arrivée des patients aux soins intensifs, car cela nécessiterait l'installation d'un drain ventriculaire externe par chirurgie, qui n'est pas effectuée à tous les patients de manière systématique (420). D'autre part, ce modèle ne semble pas représentatif de la biologie de la protéine MFG-E8 puisque l'étude de sa bio-distribution chez la souris a montré qu'elle n'était pas capable de traverser la BHE (421). Ce qui semble en accord avec notre étude et l'hypothèse selon laquelle l'action bénéfique de la protéine MFG-E8 dans le cas des HSA est liée à la diminution de l'inflammation systémique qui se répercute par la diminution de l'infiltration des monocytes et des neutrophiles dans le cerveau. Au contraire, notre mode d'injection est envisageable en condition clinique, car l'injection IP chez la souris est considérée comme équivalente à l'administration intraveineuse chez l'humain (422). Il serait donc possible de donner la protéine MFG-E8 dès la validation d'une HSA chez les patients par voie

intraveineuse, une méthode de routine peu invasive. L'une des difficultés pointées dans les études de pharmacocinétique chez le cochon est le fait que la protéine MFG-E8 est rapidement séquestrée dans le foie à la suite de son injection intraveineuse (423). Ce phénomène limite la possibilité de son utilisation dans le cas de maladies neurodégénératives chroniques dans lesquelles des injections quotidiennes seraient nécessaires pour maintenir un niveau plasmatique efficace de cette protéine (415). Néanmoins, dans le cas des HSA les patients sont hospitalisés durant plusieurs jours. Il serait donc envisageable de faire des injections répétées dans les 72 premières heures suivant l'évènement hémorragique. Toutefois, la protéine MFG-E8 augmente la phagocytose des neurones vivants si elle est administrée en trop grande quantité (119). Son administration devra donc être parfaitement contrôlée pour éviter l'apparition d'effets secondaires. D'ailleurs, durant la mise en place de notre modèle, nous avons testé l'effet de trois injections de la protéine MFG-E8 au moment de l'injection, à 24h et 48h après l'induction de l'HSA. Nous avons constaté que la réalisation de ces 3 injections était associée à l'aggravation de l'état de santé des souris traitées probablement à cause de la phagocytose exagérée des cellules vivantes. Dans l'ensemble, cette étude est encourageante, car elle confirme le potentiel thérapeutique de la protéine MFG-E8 dans le cas des HSA. Elle montre aussi que la diminution de l'inflammation précoce est nécessaire pour limiter l'inflammation cérébrale chronique et la gravité des symptômes dans notre modèle murin d'HSA.

Notre dernière étude avait pour but de décrire le plus précisément possible l'évolution des cellules immunitaires sanguines au cours du temps chez les patients HSA. Cette étude a permis l'obtention d'un grand nombre de résultats pouvant donner lieu à une grande panoplie d'interprétations et de statistiques. En conséquence, nous discuterons ici uniquement des résultats qui nous semblent pertinents dans le cadre de ce projet de recherche.

Les HSA sont des pathologies dévastatrices et complexes liées majoritairement à un mauvais pronostic. Les connaissances de la physiopathologie et des acteurs moléculaires restent actuellement insuffisantes. C'est pourquoi de plus en plus d'études se concentrent sur la recherche de biomarqueurs pour faciliter la prise en charge de cette population de patients dans le besoin. En effet, la caractérisation de biomarqueurs pourrait faciliter le développement de nouvelles stratégies de diagnostics et de traitements dans le but d'optimiser la prise en charge des patients et de s'orienter vers une médecine personnalisée. Nous rappelons ici que les

stratégies actuelles de traitement des HSA se limitent à la réparation de l'anévrisme pour éviter d'autres saignements (424). L'une des limites dans l'utilisation de matériel humain est l'accès à ces derniers. Dans le cas des HSA, le sang et le LCR sont les plus facilement accessibles du fait de l'hospitalisation souvent nécessaire des patients et de l'installation d'un drain ventriculaire. La présence d'une inflammation systémique secondaire aux HSA est bien caractérisée dans différentes études prospectives humaines (425, 426). Une analyse transcriptomique des cellules sanguines périphériques de patients HSA a montré l'importante augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation et les réponses immunitaires (427). Cette étude confirme que les cellules immunitaires sanguines sont étroitement liées avec la physiopathologie de l'HSA. Dans la course pour la découverte de nouveaux biomarqueurs effectuée en recherche, les PBMC sont les grandes favorites. Elles ont l'avantage d'être facilement isolables en laboratoire et permettent l'analyse de pratiquement toutes les cellules immunitaires en même temps (excepté les granulocytes). Des études prospectives suggèrent que l'augmentation précoce des leucocytes sanguins est associée à la survenue de complications incluant les insultes cérébrales et à un mauvais devenir des patients HSA (428).

Certaines études montrent que les patients HSA ont un nombre total de LT (CD3⁺) diminué par rapport aux DS, mais que leur activation, telle que démontrée par l'expression élevée du marqueur CD69, est augmentée chez les LT CD4⁺ et LT CD8⁺ pour des temps précoces (429). Ces observations sont en accord avec les nôtres. En effet, dans notre cohorte, nous avons remarqué que les patients HSA avaient une diminution significative du nombre de LT par rapport aux DS, mais que l'expression des marqueurs d'activation était supérieure chez les patients HSA en comparaison avec les DS. Ainsi, nous avons constaté plus d'expression du marqueur d'activation CD278 chez les LT CD4⁺ et plus d'expression des marqueurs CD25, CD69 et CD278 chez les LT CD8⁺. Néanmoins, le niveau d'expression du marqueur CD25 chez les LT CD4⁺ est inférieur à celui connu dans la littérature (430), ce qui ne permet pas de déduire un effet biologique pour ce marqueur. L'impact de la diminution du nombre de LT dans la physiopathologie de l'HSA n'est pas clair, car il semblerait que l'augmentation des LT, des LT CD4⁺ et des LT CD8⁺ soit associée à un meilleur pronostic pour les patients (431). Ceci pourrait expliquer que le nombre de LT et de LT CD4⁺ est supérieur pour nos patients BG en

comparaison aux patients HG. Ces études évoquent également une diminution des cellules NK dans le temps (431), comme nous l'avons noté dans notre cohorte de patients. De plus, l'augmentation de la proportion des cellules NK semble être liée à un meilleur pronostic chez les patients, ce qui est en accord avec le fait que dans notre étude, les cellules NK sont en plus grand nombre chez les patients BG par rapport aux patients HG. Cependant, le fait que la différence entre ces deux groupes est de 1% et que le pourcentage des cellules NK dans notre étude est plus faible que celle attendu (432), permet de douter de l'importance biologique de cette observation dans notre cohorte. La diminution de certaines cellules immunitaires est appelée immunosuppression dans la littérature. Dans une étude, les auteurs ont dichotomisé leurs patients en « symptomatiques » et « asymptomatiques » (433). Cette classification dépendait du développement ou non des DCI chez les patients. En réalité, cette classification est très proche de la nôtre, car les auteurs ont remarqué que tous les patients « symptomatiques » avaient un WFNS élevé au moment du diagnostic, ce qui correspond à nos patients HG. Leurs résultats indiquent que les patients « symptomatiques » sont caractérisés par des niveaux de monocytes supérieurs à partir de J5 et par des niveaux de LT CD4+, de LT CD8+, de LB et de cellules NK inférieurs à tous les temps en comparaison avec les patients « asymptomatiques ». Malheureusement, contrairement à notre étude, la comparaison entre les valeurs des DS pour tous les temps et de l'ensemble des patients n'a pas été faite. Cette étude est aussi plus générale que la nôtre, car elle n'a pas regardé les différents sous-types des cellules immunitaires ni les marqueurs d'activation des LT. Cependant, les auteurs ont évalué l'évolution du profil de sécrétion des cytokines dans le sang des patients ce qui permet de confirmer le potentiel pro- ou anti-inflammatoire de l'activation des cellules. Ces résultats sont très similaires aux nôtres dans lesquels les monocytes ont des niveaux largement supérieurs aux DS et des niveaux supérieurs chez les patients HG à partir de J5 pour les monocytes classiques et non classiques. Nous avons également observé des niveaux de LB, de cellules NK, de LT et de LT CD4⁺ supérieurs chez les patients HG par rapport aux patients BG, mais inférieurs aux niveaux des DS. Néanmoins, dans notre cohorte de patients les niveaux de LT CD8⁺ sont supérieurs chez les patients HG pour tous les temps étudiés et très similaires à ceux des DS. Dans l'ensemble, ces résultats valident la présence d'une immunodépression chez les patients HSA. Ce phénomène d'immunodépression a également été décrit dans le cas des accidents vasculaires cérébraux et des lésions cérébrales traumatiques (434, 435). De plus, l'analyse du profil d'expression des

gènes des cellules sanguines à la suite d'une HSA montre un profil spécifique d'expression génique suggérant une diminution de la réponse des lymphocytes et l'augmentation de l'activité des monocytes (436). Aussi, cette immunodépression est considérée comme la marque du passage d'une activation des lymphocytes Th1 vers les Th2 (437). Dans notre cohorte, cette hypothèse pourrait expliquer l'important niveau d'expression du CD278 ainsi que d'IL-4 sécrétée par les LT CD4⁺. De manière similaire à nos résultats, le lien entre l'immunodépression, le développement d'infections sévères et une mauvaise évolution clinique a été établi chez les patients avec un accident vasculaire cérébral. Cependant, la cause de cette immunodépression n'est pas totalement déterminée. De nos jours, il n'est pas clair si celle-ci dépend de l'activation des voies de stress comme l'activation du système nerveux sympathique et l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien qui sont connus pour leurs implications majeures dans l'inhibition de la fonction immunitaire (438). De surcroît, pour valider que l'immunodépression observée est uniquement secondaire aux HSA, il faudrait vérifier que celle-ci ne soit pas dépendante de la médication, comme les corticostéroïdes, et des procédures chirurgicales nécessaires pendant la prise en charge de ces patients. Enfin, la signification elle-même de cette immunodépression n'est pas résolue. D'une part, elle est associée à une aggravation des lésions cérébrales et à une augmentation du risque d'infections chez les patients. D'autre part, elle semble impliquée dans la limitation de la réponse inflammatoire cérébrale et dans la diminution des réactions immunitaires contre des auto-antigènes dérivés du cerveau (439). Dans notre étude, elle semble être en lien avec la gravité de l'HSA. Cependant, des études plus spécifiques considérant le type de prise en charge des patients et le développement d'infections pourraient être envisagées dans notre cohorte pour répondre plus précisément à ces questions.

Dans notre étude, nous avons remarqué que les patients HSA sont caractérisés par un niveau initial élevé de monocytes classiques qui diminue au cours du temps et par une augmentation progressive des monocytes non classiques. Chez les patients HG, les monocytes non classiques sont d'ailleurs significativement supérieurs aux temps tardifs. Ce phénomène est peut-être expliqué par le fait que chez les humains, la réponse inflammatoire commence par une forte libération des monocytes classiques depuis la moelle osseuse qui mûrissent secondairement pour donner des monocytes intermédiaires et non classiques (62). De même, les monocytes non

classiques sont considérés comme pro-inflammatoires chez les humains, car ils sont associés à un niveau basal élevé de production de cytokines pro-inflammatoires (440). D'autant plus, ils ont été décrits comme impliqués dans de nombreux désordres immunologiques (440, 441). Bien que nous n'ayons pas évalué la composition cellulaire du LCR des patients HSA, une étude similaire à la nôtre indique que les monocytes non classiques pro-inflammatoires sont majoritaires dans la phase précoce suivant une HSA dans le LCR de patients (442). Ces résultats sont en accord avec l'augmentation des monocytes pro-inflammatoires dans le cerveau des souris HSA observée dans notre première étude. De même, les résultats *in vitro* sur la lignée de microglie confirment que les éléments présents dans le sérum et le LCR de patients favorisent une activation accrue de la microglie. Nous avons démontré que l'application de sérum de patients HG augmentait la capacité de production de ROS et diminuait celle de phagocytose de la microglie de façon plus importante que l'application de sérum de patients BG. Ces résultats confirment que les patients HG sont associés à un profil inflammatoire plus marqué que les patients BG. Entre autres, ces résultats corroborent que l'activation de l'inflammation est dépendante de l'augmentation de la perméabilité de la BHE à la suite d'une HSA. Ces résultats témoignent également que la reprogrammation des monocytes pro-inflammatoires vers un phénotype anti-inflammatoire est une cible potentielle dans la recherche de thérapies. Elle pourrait, par exemple, passer par l'utilisation de la protéine MFG-E8 comme nous l'avons démontré dans notre seconde étude sur les souris HSA.

Il est donc évident que l'implication des leucocytes est complexe et décisive dans la physiopathologie des HSA. Un des points forts de notre étude est justement la caractérisation de presque toutes les cellules immunitaires et leurs sous-types dans une même étude. À notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir été autant en profondeur dans cette analyse. Malheureusement, l'un des points faibles de notre étude est l'absence de la caractérisation des neutrophiles qui sont éliminés par notre processus d'isolation des PBMC. Néanmoins, la formule sanguine complète est normalement réalisée en routine lors de l'hospitalisation des patients. Pour les patients où l'information était disponible et dans une étude préliminaire, nous avons remarqué que la majorité d'entre eux avaient une neutrophilie marquée au moment du diagnostic des patients. Ces résultats pourraient être validés dans des expériences futures de phénotypage des neutrophiles des patients. La confirmation de l'activation et de l'augmentation

des neutrophiles chez les patients pourrait confirmer celle observée chez les souris HSA et valider le potentiel thérapeutique de la protéine MGF-E8.

Les analyses permettant la comparaison de l'évolution des cellules immunitaires avec les DS et en fonction du grade des patients semblent indiquer que les patients ne sont pas égaux dans la qualité des réponses immunitaires et inflammatoires en réponse aux HSA. Dans le cadre de l'optimisation de la médecine personnalisée, nous avons voulu savoir si le genre des patients influençait l'incidence, la gravité ainsi que le type de réponses inflammatoires et immunitaires activées à la suite d'une HSA. Cette interrogation n'est pas nouvelle dans la littérature et les résultats sont plutôt controversés. Les premières études montraient que la proportion des femmes était plus importante que celle des hommes (443) et que les HSA survenaient à un âge moyen plus avancé chez les femmes que chez les hommes (444). De plus, l'âge est considéré comme un important prédicteur du mauvais devenir des patients (445). Il était donc courant de voir une confusion entre l'incidence et la gravité des HSA. Depuis, le sexe masculin s'est révélé être un facteur prédicteur de mauvais pronostic chez les jeunes patients HSA (446). Dans notre cohorte, nous avons remarqué que les hommes avaient effectivement un âge moyen plus jeune d'environ 2 ans que les femmes au moment du diagnostic. Malgré le fait que la proportion de femmes avec un haut grade est supérieure à celui des hommes au moment du diagnostic, le devenir à un an est meilleur pour les femmes. Ces résultats confirment que le sexe masculin est associé à un moins bon devenir.

Cependant, il faut tenir compte que ces études étaient majoritairement épidémiologiques et ne se concentraient pas sur la caractérisation de l'évolution des cellules immunitaires en fonction du sexe des patients. À notre connaissance, nous sommes les premiers à avoir étudié l'évolution des PBMC en fonction du genre des patients HSA. Néanmoins, des études ont déjà tenté d'expliquer cette différence observée en fonction du sexe des patients. Une étude sur un modèle de rats par l'utilisation du modèle de suture endovasculaire a montré que les rats mâles avaient un mauvais devenir et une gravité plus importante que les femelles. Dans cette étude, les rats mâles avaient une neutrophilie plus marquée dans le cerveau, une mort neuronale plus importante et une moins bonne survie à 24h que les femelles (447). L'une des explications avancées dans ce genre d'étude est l'implication des hormones sexuelles dans le processus inflammatoire (448). L'œstrogène est l'hormone principale du sexe féminin. Elle est impliquée

dans la vasodilatation des vaisseaux et dans la formation des anévrismes (449). Dans un modèle d'HSA par injection dans la citerne chiasmatisque sur des rats, le traitement continu par les œstrogènes diminue la survenue et la gravité du vasospasme (450). Dans le SNC, cette hormone est capable de diminuer la peroxydation des lipides (451) et le stress oxydatif par la diminution de l'activation inflammatoire de la microglie (452). De plus, dans un modèle d'HSA par injection de sang dans la citerne chiasmatisque de rats, le traitement par le tamoxifène, un modulateur spécifique du récepteur aux œstrogènes est associé à la diminution de la voie NFκB et de l'apparition des ischémies cérébrales précoces (453). Toutefois, nous pensons que cette stratégie thérapeutique n'a pas été développée du fait du risque potentiel de développement de cancer du sein, d'endométriose, de dysfonctions gastro-intestinales, de thromboses veineuses ou d'infarctus du myocarde (449).

L'utilisation de la progestérone a également été envisagée et semblait très prometteuse. Dans des modèles animaux, son efficacité dans la diminution du vasospasme et de la mortalité secondaire aux HSA a bien été caractérisée (454, 455). Elle est impliquée dans la stabilité de la BHE et la diminution des ischémies cérébrales précoces ainsi que dans la diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires dans des modèles d'induction de l'HSA chez les rats (456, 457). Cependant, des essais cliniques de phase III ont montré l'absence d'efficacité du traitement par la progestérone malgré des résultats prometteurs pour les essais de phase I et II (458). Cet échec nous rappelle que la marche entre les études sur les modèles animaux et les essais cliniques est bien souvent très haute.

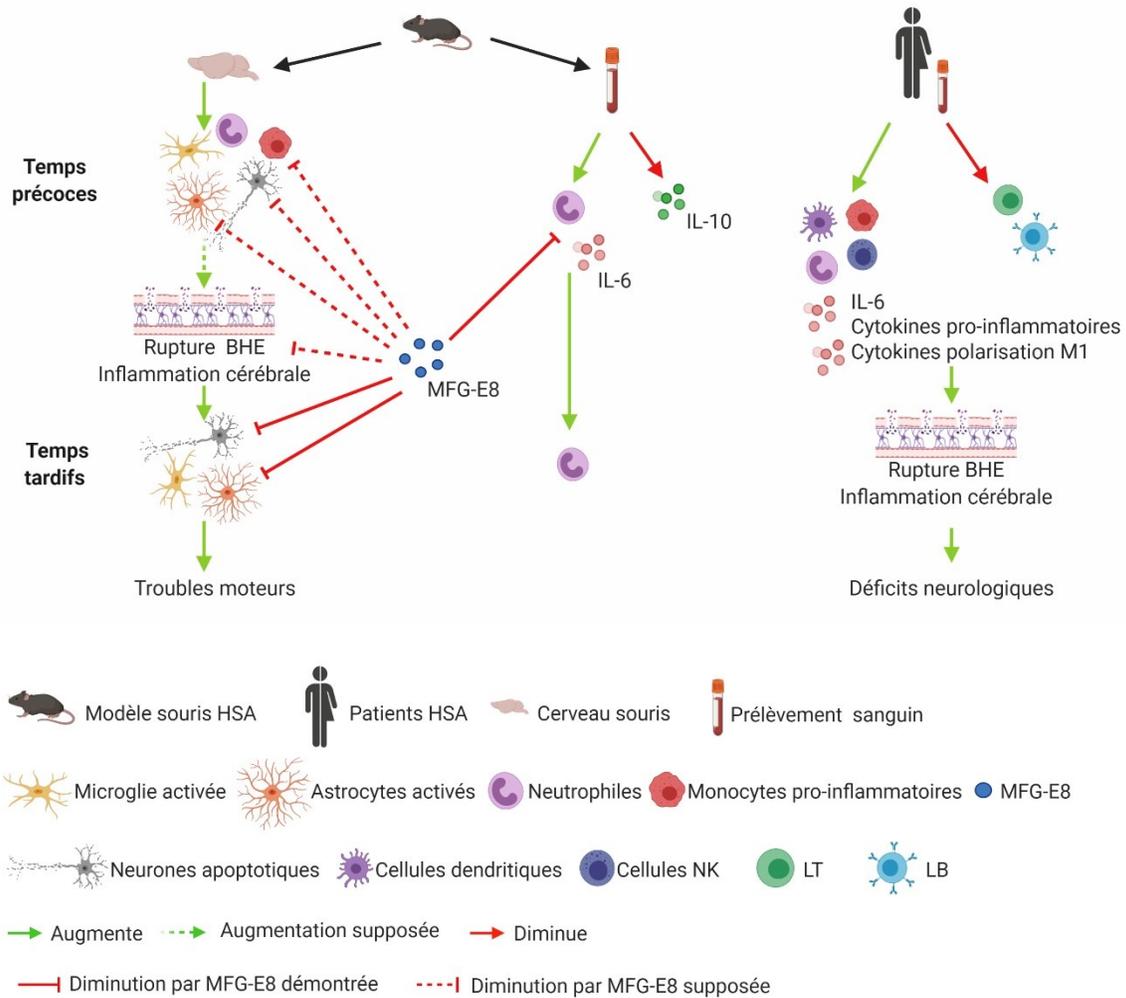
La testostérone, l'hormone sexuelle masculine, est également connue pour ses fonctions anti-inflammatoires et neuroprotectrices dans le SNC (459), mais son implication dans la physiopathologie des HSA n'est pas claire. Dans un modèle lapins d'HSA, cette hormone est capable de diminuer la survenue du vasospasme, mais son mécanisme reste incertain (460). Au contraire, la déplétion de la testostérone dans les accidents vasculaires cérébraux ischémiques est associée à la diminution de la taille de la zone lésée et des insultes secondaires à la reperfusion (461).

En définitive, le rôle des hormones sexuelles est remis en question, car la plupart des femmes touchées par les HSA sont ménopausées avec un niveau bas d'œstrogènes. De même, la différence en fonction des sexes semble plus profonde vu que les souris mâles possèdent à

l'état basal une plus grande densité de microglie avec une morphologie amiboïde (similaire à leur forme activée) ainsi que des astrocytes plus ramifiés que les femelles (462). Ceci confirme l'importance d'une meilleure compréhension de l'influence du genre dans la physiopathologie et la sévérité des HSA. De plus, si l'influence du genre dans la physiopathologie de l'HSA s'avère biologiquement explicable, il faudrait étudier l'impact du facteur confondant éventuel entre le sexe du patient et la sévérité de l'HSA. En tout état de cause, il est décevant de voir que malgré le nombre grandissant de preuves de l'existence d'une différence en fonction du genre des patients, les études sur les modèles animaux restent presque exclusivement sur des animaux mâles. Notre étude elle-même aurait plus d'impact si la comparaison de l'évolution des cellules immunitaires en fonction du sexe des patients pouvait être mise en relation avec une étude sexuelle dans notre modèle murin.

Dans l'ensemble, nos résultats sur l'analyse en fonction du genre des patients nous ont permis de mettre en évidence une différence dans le profil d'activation et le maintien de l'inflammation chez les patients. Nous avons constaté que les hommes avaient des niveaux plus élevés à partir de J1 de tous les sous-types de monocytes et des cellules NK ainsi qu'un profil d'activation des LT CD8⁺ et LT CD4⁺ plus important que les femmes. L'étude *in vitro* a montré que l'application de sérum de patients de sexe masculin augmentait la capacité de production de ROS et diminuait celle de phagocytose de façon plus marquée que l'application de sérum de patients de sexe féminin. Ces résultats indiquent que les hommes possèdent dans leur sérum des éléments favorisant la mise en place d'un terrain inflammatoire plus important que les femmes. Ces résultats semblent indiquer que les hommes sont caractérisés par un état inflammatoire plus accentué et par une immunodépression moins efficace en réponse aux HSA. De plus, cette augmentation du profil inflammatoire des hommes va dans le sens de nos observations selon lesquelles les hommes sont caractérisés par un moins bon devenir un an après le diagnostic de l'HSA.

Figure 35. Résumé de l'implication des cellules immunitaires dans l'HSA.



Légende Fig.35. Schéma général de l'implication des cellules immunitaires dans la physiopathologie de l'HSA.

Dans notre modèle souris, l'induction de l'HSA est associée à l'augmentation de la microglie activée, des astrocytes activés, des neutrophiles, des monocytes pro-inflammatoires et de la mort neuronale dans le cerveau pour des temps précoces (entre 12h et 48h). Cette inflammation précoce favorise la rupture de la BHE et le maintien d'une inflammation cérébrale à des temps tardifs (7j). Cette inflammation cérébrale est définie par la présence d'astrocytes activés, de la microglie activée et d'une importante mort neuronale. Ceci se répercute par l'apparition de troubles moteurs chez les souris. Dans le sang, l'induction de l'HSA chez les souris est associée à une augmentation de la sécrétion de l'IL-6 et des neutrophiles ainsi que par la diminution de la sécrétion de l'IL-10 à des temps précoces. Aux

temps tardifs, l'importante neutrophilie est maintenue.

Le traitement par la protéine MFG-E8 est associé à la diminution de la neutrophilie à des temps précoces dans le sang, ainsi qu'à la diminution de la mort neuronale, de l'activation des astrocytes dans le cerveau aux temps tardifs. Finalement, le traitement par la protéine MFG-E8 entraîne une diminution de la sévérité des symptômes. Nous pensons que la diminution tardive de l'inflammation cérébrale traduit la diminution de l'inflammation cérébrale précoce et la diminution de la perméabilité de la BHE qui n'ont pas été vérifiées dans notre étude.

Chez les patients HSA, une importante inflammation systémique et une immunodépression sont observées pour tous les temps étudiés. L'augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la rupture de la BHE traduit l'augmentation de sa perméabilité et l'apparition de déficits neurologiques.

En conclusion, cette étude confirme la présence d'une signature immunologique similaire entre notre modèle murin et les patients. Elle témoigne également du potentiel thérapeutique de la protéine MFG-E8 dans le cas des HSA.

Conclusion

Nos premiers résultats sur notre modèle murin d'HSA démontrent une activation inflammatoire et l'apparition de déficits moteurs chez les souris HSA similaires à ceux des patients. Ces premiers résultats sont encourageants, car ils confirment que l'inflammation cérébrale précoce (activation des astrocytes, de la microglie, des neutrophiles et des monocytes pro-inflammatoires) est en lien avec l'apparition de déficits moteurs secondaires à la mort neuronale par apoptose de façon retardée (7j). Cette étude a également permis de confirmer la présence d'une inflammation systémique consécutive secondaire aux HSA dans notre modèle animal et chez les patients. Enfin, nous avons montré que les facteurs présents dans le plasma de patients étaient tous en lien avec la promotion de l'inflammation, de la polarisation M1 des macrophages et de la rupture de la BHE.

Cette première étude nous a finalement orientés vers la recherche de facteurs diminuant cette inflammation cérébrale, la rupture de la BHE et la polarisation des M1. La protéine MFG-E8 connue dans notre laboratoire pour ses fonctions anti-inflammatoires et la promotion de la reprogrammation des macrophages vers un sous-type M2 dans l'insulte rénale ou la réparation tissulaire (116, 286, 287) nous a semblé prometteuse. Ainsi, nous avons testé la protéine MFG-E8 dans notre modèle murin pour évaluer ses fonctions immunomodulatrices dans les HSA. Dans notre deuxième étude, nous avons montré que l'injection IP de la protéine MFG-E8 entraînait la diminution de l'inflammation systémique et cérébrale par la diminution du rapport des marqueurs M1/M2 dans le cerveau, de l'activation des astrocytes, de la mort neuronale ainsi que de la gravité des symptômes. Ces résultats sont très encourageants, car ils démontrent que l'utilisation de la protéine MFG-E8 avec un mode d'administration simple et reproductible chez les patients pourrait permettre la diminution de la gravité des HSA. Les répercussions potentielles de cette étude ne se limitent pas aux HSA, car la validation de l'effet anti-inflammatoire dans le cerveau de la protéine MFG-E8 pourrait servir dans un grand nombre de pathologies cérébrales où l'inflammation est la principale cause des symptômes. En définitive, notre étude sur le potentiel thérapeutique de la protéine MFG-E8 dans le cas des HSA nécessiterait une confirmation par l'utilisation d'un deuxième modèle animal de plus grande taille ou plus proche de l'humain. Ainsi, cette validation pourrait à long terme permettre l'émergence d'études cliniques pour cette population de patients dans le besoin.

Évidemment, la première étape nécessaire à la poursuite de ce projet serait de refaire nos deux premières études avec des souris de sexe féminin. Ceci nous permettrait de confirmer la différence observée chez nos patients et la comparabilité possible entre notre modèle murin et les patients. Néanmoins, ces deux études pourraient être améliorées par la réalisation de quelques tests supplémentaires. Premièrement, nous pensons qu'il serait pertinent d'évaluer les autres types de morts cellulaires. L'utilisation des méthodes avec le fluorojade-B et de la méthode *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) ont été essayées dans notre première étude, mais leurs mises au point n'étant pas optimale et complète, nous avons décidé de nous concentrer sur la quantification de l'apoptose des neurones. Secondement, il aurait été approprié de valider le profil inflammatoire par la visualisation des voies telles que le NFκB ou l'inflammasome. Des essais de cytométrie en flux ont été commencés pour évaluer la voie de l'inflammasome par le NLRP3 et l'IL-1β. Des études futures incluant des méthodes spécifiques de biologie moléculaire, comme le bavardage Western, pourraient être envisagées. Pour finir, l'étude de l'effet de la protéine MFG-E8 sur la différenciation des astrocytes (A1 et A2) ou de la microglie (M1-like et M2-like) pourrait être envisagé dans notre modèle de culture cellulaire. Cette expérience permettrait de démontrer l'efficacité de cette protéine sur l'inflammation cérébrale humaine. Dans des essais préliminaires, nous avons déterminé la dose efficace de la protéine MFG-E8 sur des lignées de microglie et d'astrocytes humaines pour diminuer la capacité de production de ROS et augmenter celle de phagocytose. Il serait donc envisageable de continuer ce travail tout en développant un panel de cytométrie en flux adéquat pour confirmer la polarisation pro- ou anti-inflammatoire de la lignée cellulaire d'intérêt.

Notre dernière étude nous a permis de confirmer la présence d'une immunodépression et de l'augmentation des cellules immunitaires innées chez les patients HSA par rapport aux DS dans notre cohorte. Nous avons remarqué que le profil inflammatoire était plus important chez les patients HG par rapport aux patients BG. Pour finir, nous avons décrit une augmentation des cellules immunitaires innées et une diminution de l'immunodépression chez les hommes par rapport aux femmes. Il est important de noter que la caractérisation d'un profil d'activation inflammatoire différent selon le sexe du patient pourrait influencer et optimiser la prise en charge des patients dans un grand nombre de pathologies. Les répercussions potentielles à long

terme de ce genre d'études sont donc très grandes. Notre étude pourrait être complétée par une analyse permettant de faire le lien entre l'âge et le sexe des patients. En effet, une analyse par âge permettrait de confirmer que les hommes ont un profil inflammatoire plus marqué et une maladie plus grave que les femmes pour un âge équivalent. Pour être plus précis, nous pourrions également analyser le devenir des patients (mRS) en fonction du sexe et du grade des patients. Afin de vérifier l'impact de l'immunodépression, il serait intéressant de faire une analyse incluant le mode de prise en charge des patients. Cette analyse permettrait de savoir si l'immunodépression est dépendante du type de chirurgie ou du type de médication que reçoivent les patients. Évidemment, le dosage des cytokines du LCR et du plasma apporterait une information non négligeable sur l'état inflammatoire de chaque patient et devra être envisagé dans la poursuite de ce projet. Notre modèle d'analyse statistique pourrait être utilisé pour corrélérer le niveau de certaines cytokines avec la sévérité des HSA. Pour finir, une étude ultérieure sur la caractérisation du profil d'activation des neutrophiles sanguins chez les patients pourrait être envisagée. Cette étude pourrait permettre de confirmer la présence d'une neutrophilie chez les patients HSA tant au niveau sanguin que cérébral, de confirmer la neutrophilie marquée observée dans notre modèle animal et de décrire l'importance des neutrophiles dans la physiopathologie des HSA.

En conclusion, ce projet de thèse a permis de valider la reproductibilité de notre modèle murin d'HSA. Ce modèle nous a permis de caractériser la séquence d'activation des cellules immunitaires sanguines et cérébrales des souris HSA. Nous avons également étudié le potentiel thérapeutique de la protéine MFG-E8 dans les HSA. Les prélèvements sanguins sur les patients nous ont servis pour la description complète de l'évolution des cellules immunitaires périphérique au cours du temps chez les patients HSA. Nous avons comparé cette évolution des cellules immunitaires au cours du temps avec les DS ainsi qu'en fonction du grade et du sexe des patients. Enfin, la mise en place d'un modèle *in vitro* de la lignée cellulaire de microglie nous a permis de valider le potentiel inflammatoire des éléments présents dans le sérum et le LCR de patients HSA.

Références

1. Hirayama D, Iida T, Nakase H. The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis. *Int J Mol Sci.* 2017;19(1).
2. Gasteiger G, D'Osualdo A, Schubert DA, Weber A, Bruscia EM, Hartl D. Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *J Innate Immun.* 2017;9(2):111-25.
3. Pancer Z, Cooper MD. The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 2006;24:497-518.
4. Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:99-126.
5. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 2007;37 Suppl 1:S34-45.
6. Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45(2):27-37.
7. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:217-42.
8. Holtmann H, Resch K. Cytokines. *Naturwissenschaften.* 1995;82(4):178-87.
9. Ward PA AS. Acute and Chronic Inflammation. In: Serhan CN WP, Gilroy DW, editor. *Fundamentals of Inflammation.* Cambridge: Cambridge University Press; 2010. p. 1–16.
10. Kumar V, Robbins SL. *Robbins basic pathology.* 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2007. xiv, 946 p. p.
11. Beg AA. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. *Trends Immunol.* 2002;23(11):509-12.
12. Franz KM, Kagan JC. Innate Immune Receptors as Competitive Determinants of Cell Fate. *Mol Cell.* 2017;66(6):750-60.
13. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388(6640):394-7.
14. O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(5):353-64.
15. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801.
16. Lehnardt S. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia.* 2010;58(3):253-63.
17. Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol.* 2009;21(4):242-53.
18. Klos A, Tenner AJ, Johswich KO, Ager RR, Reis ES, Kohl J. The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol.* 2009;46(14):2753-66.
19. Bertaina A, Andreani M. Major Histocompatibility Complex and Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Beyond the Classical HLA Polymorphism. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2).
20. Ruddy S. Chemistry and biologic activity of the complement system. *Transplant Proc.* 1974;6(1):1-7.
21. Sjöberg AP, Trouw LA, Blom AM. Complement activation and inhibition: a delicate balance. *Trends Immunol.* 2009;30(2):83-90.
22. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res.* 2011;343(1):227-35.

23. Wallis R. Interactions between mannose-binding lectin and MASPs during complement activation by the lectin pathway. *Immunobiology*. 2007;212(4-5):289-99.
24. Qu H, Ricklin D, Lambris JD. Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. *Mol Immunol*. 2009;47(2-3):185-95.
25. Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol*. 2006;176(3):1305-10.
26. Ohno M, Hirata T, Enomoto M, Araki T, Ishimaru H, Takahashi TA. A putative chemoattractant receptor, C5L2, is expressed in granulocyte and immature dendritic cells, but not in mature dendritic cells. *Mol Immunol*. 2000;37(8):407-12.
27. Poppelaars F, Faria B, Gaya da Costa M, Franssen CFM, van Son WJ, Berger SP, et al. The Complement System in Dialysis: A Forgotten Story? *Front Immunol*. 2018;9:71.
28. Lokaj J, John C. [Ilya Ilich Metchnikov and Paul Ehrlich: 1908 Nobel Prize winners for their research on immunity]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol*. 2008;57(4):119-24.
29. Desjardins M, Houde M, Gagnon E. Phagocytosis: the convoluted way from nutrition to adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2005;207:158-65.
30. Reddien PW, Horvitz HR. The engulfment process of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004;20:193-221.
31. Lichanska AM, Hume DA. Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Exp Hematol*. 2000;28(6):601-11.
32. Brown GC, Vilalta A, Fricker M. Phagoptosis - Cell Death By Phagocytosis - Plays Central Roles in Physiology, Host Defense and Pathology. *Curr Mol Med*. 2015;15(9):842-51.
33. Gordon S. Phagocytosis: An Immunobiologic Process. *Immunity*. 2016;44(3):463-75.
34. Duclos S, Diez R, Garin J, Papadopoulou B, Descoteaux A, Stenmark H, et al. Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 19:3531-41.
35. Proto JD, Doran AC, Gusarova G, Yurdagul A, Jr., Sozen E, Subramanian M, et al. Regulatory T Cells Promote Macrophage Efferocytosis during Inflammation Resolution. *Immunity*. 2018;49(4):666-77 e6.
36. Falcone S, Cocucci E, Podini P, Kirchhausen T, Clementi E, Meldolesi J. Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 22):4758-69.
37. West MA, Wallin RP, Matthews SP, Svensson HG, Zaru R, Ljunggren HG, et al. Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science*. 2004;305(5687):1153-7.
38. Mousavi SA, Malerod L, Berg T, Kjekken R. Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J*. 2004;377(Pt 1):1-16.
39. Nabi IR, Le PU. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol*. 2003;161(4):673-7.
40. PrabhuDas MR, Baldwin CL, Bollyky PL, Bowdish DME, Drickamer K, Febbraio M, et al. A Consensus Definitive Classification of Scavenger Receptors and Their Roles in Health and Disease. *J Immunol*. 2017;198(10):3775-89.
41. Stern ST, Adiseshaiyah PP, Crist RM. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Part Fibre Toxicol*. 2012;9:20.
42. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.

43. Ameisen JC. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.* 2002;9(4):367-93.
44. Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis. Life and death decisions. *Science.* 2003;299(5604):214-5.
45. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):770-6.
46. Xu X, Lai Y, Hua ZC. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep.* 2019;39(1).
47. Segawa K, Nagata S. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol.* 2015;25(11):639-50.
48. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol.* 2001;11(12):526-34.
49. Van Opendenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity.* 2019;50(6):1352-64.
50. Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis.* 2014;19(4):555-66.
51. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:143-83.
52. Shakeri R, Kheirollahi A, Davoodi J. Apaf-1: Regulation and function in cell death. *Biochimie.* 2017;135:111-25.
53. Kim HE, Du F, Fang M, Wang X. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(49):17545-50.
54. Bano D, Prehn JHM. Apoptosis-Inducing Factor (AIF) in Physiology and Disease: The Tale of a Repented Natural Born Killer. *EBioMedicine.* 2018;30:29-37.
55. Zhou JX, Li X. Apoptosis in Polycystic Kidney Disease: From Pathogenesis to Treatment. In: Li X, editor. *Polycystic Kidney Disease.* Brisbane (AU)2015.
56. Hirsch JG. Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff. *Bacteriol Rev.* 1959;23(2):48-60.
57. Hume DA, Irvine KM, Pridans C. The Mononuclear Phagocyte System: The Relationship between Monocytes and Macrophages. *Trends Immunol.* 2019;40(2):98-112.
58. Minutti CM, Knipper JA, Allen JE, Zaiss DM. Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;61:3-11.
59. Sica A, Invernizzi P, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. *Hepatology.* 2014;59(5):2034-42.
60. Barker RN, Erwig LP, Hill KS, Devine A, Pearce WP, Rees AJ. Antigen presentation by macrophages is enhanced by the uptake of necrotic, but not apoptotic, cells. *Clin Exp Immunol.* 2002;127(2):220-5.
61. Murray RZ, Stow JL. Cytokine Secretion in Macrophages: SNAREs, Rab, and Membrane Trafficking. *Front Immunol.* 2014;5:538.
62. Patel AA, Zhang Y, Fullerton JN, Boelen L, Rongvaux A, Maini AA, et al. The fate and lifespan of human monocyte subsets in steady state and systemic inflammation. *J Exp Med.* 2017;214(7):1913-23.
63. Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2007;179(8):5228-37.

64. Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res.* 2012;53(1-3):41-57.
65. Hartley G, Regan D, Guth A, Dow S. Regulation of PD-L1 expression on murine tumor-associated monocytes and macrophages by locally produced TNF-alpha. *Cancer Immunol Immunother.* 2017;66(4):523-35.
66. Ingersoll MA, Platt AM, Potteaux S, Randolph GJ. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.* 2011;32(10):470-7.
67. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):762-74.
68. Spahn JH, Kreisel D. Monocytes in sterile inflammation: recruitment and functional consequences. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2014;62(3):187-94.
69. Yang J, Zhang L, Yu C, Yang XF, Wang H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res.* 2014;2(1):1.
70. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* 2013;229(2):176-85.
71. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 2004;25(12):677-86.
72. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:541-66.
73. Hesketh M, Sahin KB, West ZE, Murray RZ. Macrophage Phenotypes Regulate Scar Formation and Chronic Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7).
74. Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C. Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1745(3):287-99.
75. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-kappaB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2.
76. Zhang J, Liu X, Wan C, Liu Y, Wang Y, Meng C, et al. NLRP3 inflammasome mediates M1 macrophage polarization and IL-1beta production in inflammatory root resorption. *J Clin Periodontol.* 2020;47(4):451-60.
77. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell.* 2002;10(2):417-26.
78. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(13).
79. Song L, Pei L, Yao S, Wu Y, Shang Y. NLRP3 Inflammasome in Neurological Diseases, from Functions to Therapies. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:63.
80. Chen X, Liu G, Yuan Y, Wu G, Wang S, Yuan L. NEK7 interacts with NLRP3 to modulate the pyroptosis in inflammatory bowel disease via NF-kappaB signaling. *Cell Death Dis.* 2019;10(12):906.
81. Bashir S, Sharma Y, Elahi A, Khan F. Macrophage polarization: the link between inflammation and related diseases. *Inflamm Res.* 2016;65(1):1-11.
82. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R453-62.
83. Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS, Albina JE. The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol.* 2010;87(1):59-67.

84. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-95.
85. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e23.
86. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(1):23-35.
87. Muraille E, Leo O, Moser M. TH1/TH2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front Immunol.* 2014;5:603.
88. Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:451-83.
89. Goenka S, Kaplan MH. Transcriptional regulation by STAT6. *Immunol Res.* 2011;50(1):87-96.
90. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin HH, Brown GD, Gordon S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:901-44.
91. Chinetti-Gbaguidi G, Colin S, Staels B. Macrophage subsets in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2015;12(1):10-7.
92. Luzina IG, Keegan AD, Heller NM, Rook GA, Shea-Donohue T, Atamas SP. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *J Leukoc Biol.* 2012;92(4):753-64.
93. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol.* 2006;80(6):1298-307.
94. Wang LX, Zhang SX, Wu HJ, Rong XL, Guo J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol.* 2019;106(2):345-58.
95. Ferrante CJ, Pinhal-Enfield G, Elson G, Cronstein BN, Hasko G, Outram S, et al. The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4Ralpha) signaling. *Inflammation.* 2013;36(4):921-31.
96. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-40.
97. Oshima K, Aoki N, Kato T, Kitajima K, Matsuda T. Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles. *Eur J Biochem.* 2002;269(4):1209-18.
98. Bu HF, Zuo XL, Wang X, Ensslin MA, Koti V, Hsueh W, et al. Milk fat globule-EGF factor 8/lactadherin plays a crucial role in maintenance and repair of murine intestinal epithelium. *J Clin Invest.* 2007;117(12):3673-83.
99. Leonardi-Essmann F, Emig M, Kitamura Y, Spanagel R, Gebicke-Haerter PJ. Fractalkine-upregulated milk-fat globule EGF factor-8 protein in cultured rat microglia. *J Neuroimmunol.* 2005;160(1-2):92-101.
100. Kranich J, Krautler NJ, Falsig J, Ballmer B, Li S, Hutter G, et al. Engulfment of cerebral apoptotic bodies controls the course of prion disease in a mouse strain-dependent manner. *J Exp Med.* 2010;207(10):2271-81.
101. Cheyuo C, Aziz M, Yang WL, Jacob A, Zhou M, Wang P. Milk fat globule-EGF factor VIII attenuates CNS injury by promoting neural stem cell proliferation and migration after cerebral ischemia. *PLoS One.* 2015;10(4):e0122833.
102. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature.* 2002;417(6885):182-7.

103. Akakura S, Singh S, Spataro M, Akakura R, Kim JI, Albert ML, et al. The opsonin MFG-E8 is a ligand for the alphavbeta5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Exp Cell Res*. 2004;292(2):403-16.
104. Mukundan L, Odegaard JI, Morel CR, Heredia JE, Mwangi JW, Ricardo-Gonzalez RR, et al. PPAR-delta senses and orchestrates clearance of apoptotic cells to promote tolerance. *Nat Med*. 2009;15(11):1266-72.
105. Ait-Oufella H, Kinugawa K, Zoll J, Simon T, Boddaert J, Heeneman S, et al. Lactadherin deficiency leads to apoptotic cell accumulation and accelerated atherosclerosis in mice. *Circulation*. 2007;115(16):2168-77.
106. Kruse K, Janko C, Urbonaviciute V, Mierke CT, Winkler TH, Voll RE, et al. Inefficient clearance of dying cells in patients with SLE: anti-dsDNA autoantibodies, MFG-E8, HMGB-1 and other players. *Apoptosis*. 2010;15(9):1098-113.
107. Asano K, Miwa M, Miwa K, Hanayama R, Nagase H, Nagata S, et al. Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody production in mice. *J Exp Med*. 2004;200(4):459-67.
108. Zhang F, Shah KG, Qi L, Wu R, Barrera R, Nicastro J, et al. Milk fat globule epidermal growth factor-factor 8 mitigates inflammation and tissue injury after hemorrhagic shock in experimental animals. *J Trauma Acute Care Surg*. 2012;72(4):861-9.
109. Uchiyama A, Yamada K, Ogino S, Yokoyama Y, Takeuchi Y, Udey MC, et al. MFG-E8 regulates angiogenesis in cutaneous wound healing. *Am J Pathol*. 2014;184(7):1981-90.
110. Motegi S, Leitner WW, Lu M, Tada Y, Sardy M, Wu C, et al. Pericyte-derived MFG-E8 regulates pathologic angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(9):2024-34.
111. Das A, Ghatak S, Sinha M, Chaffee S, Ahmed NS, Parinandi NL, et al. Correction of MFG-E8 Resolves Inflammation and Promotes Cutaneous Wound Healing in Diabetes. *J Immunol*. 2016;196(12):5089-100.
112. Sugano G, Bernard-Pierrot I, Lae M, Battail C, Allory Y, Stransky N, et al. Milk fat globule--epidermal growth factor--factor VIII (MFGE8)/lactadherin promotes bladder tumor development. *Oncogene*. 2011;30(6):642-53.
113. Tan Y, AlKhamees B, Jia D, Li L, Couture JF, Figeys D, et al. MFG-E8 Is Critical for Embryonic Stem Cell-Mediated T Cell Immunomodulation. *Stem Cell Reports*. 2015;5(5):741-52.
114. Aziz MM, Ishihara S, Mishima Y, Oshima N, Moriyama I, Yuki T, et al. MFG-E8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis by modulating osteopontin-dependent alphavbeta3 integrin signaling. *J Immunol*. 2009;182(11):7222-32.
115. Cheyuo C, Jacob A, Wu R, Zhou M, Qi L, Dong W, et al. Recombinant human MFG-E8 attenuates cerebral ischemic injury: its role in anti-inflammation and anti-apoptosis. *Neuropharmacology*. 2012;62(2):890-900.
116. Brissette MJ, Lepage S, Lamonde AS, Sirois I, Groleau J, Laurin LP, et al. MFG-E8 released by apoptotic endothelial cells triggers anti-inflammatory macrophage reprogramming. *PLoS One*. 2012;7(4):e36368.
117. Deroide N, Li X, Lerouet D, Van Vre E, Baker L, Harrison J, et al. MFGE8 inhibits inflammasome-induced IL-1beta production and limits postischemic cerebral injury. *J Clin Invest*. 2013;123(3):1176-81.
118. Aziz M, Jacob A, Matsuda A, Wu R, Zhou M, Dong W, et al. Pre-treatment of recombinant mouse MFG-E8 downregulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages via STAT3-mediated SOCS3 activation. *PLoS One*. 2011;6(11):e27685.

119. Fricker M, Neher JJ, Zhao JW, Thery C, Tolkovsky AM, Brown GC. MFG-E8 mediates primary phagocytosis of viable neurons during neuroinflammation. *J Neurosci.* 2012;32(8):2657-66.
120. Fuller AD, Van Eldik LJ. MFG-E8 regulates microglial phagocytosis of apoptotic neurons. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2008;3(4):246-56.
121. Kawabe K, Takano K, Moriyama M, Nakamura Y. Microglia Endocytose Amyloid beta Through the Binding of Transglutaminase 2 and Milk Fat Globule EGF Factor 8 Protein. *Neurochem Res.* 2018;43(1):41-9.
122. Kay AB. Paul Ehrlich and the Early History of Granulocytes. *Microbiol Spectr.* 2016;4(4).
123. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997;89(10):3503-21.
124. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010;31(8):318-24.
125. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 2007;28(8):340-5.
126. Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2006;2(3):98-108.
127. Bekkering S. Another look at the life of a neutrophil. *World Journal of Hematology.* 2013;2(2).
128. Lakschevitz FS, Hassanpour S, Rubin A, Fine N, Sun C, Glogauer M. Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Exp Cell Res.* 2016;342(2):200-9.
129. Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, Gehling UM, et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(2):431-6.
130. Serhan CN, Ward PA, Gilroy DW. *Fundamentals of inflammation.* Cambridge ; New York: Cambridge University Press; 2010. 1 ressource en ligne (xiv, 473 pages) p.
131. Potera RM, Jensen MJ, Hilkin BM, South GK, Hook JS, Gross EA, et al. Neutrophil azurophilic granule exocytosis is primed by TNF-alpha and partially regulated by NADPH oxidase. *Innate Immun.* 2016;22(8):635-46.
132. Gallin JI. Neutrophil specific granule deficiency. *Annu Rev Med.* 1985;36:263-74.
133. Sheshachalam A, Srivastava N, Mitchell T, Lacy P, Eitzen G. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Front Immunol.* 2014;5:448.
134. Ivetic A. A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour. *Cell Tissue Res.* 2018;371(3):437-53.
135. Rose S, Misharin A, Perlman H. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. *Cytometry A.* 2012;81(4):343-50.
136. Hahn J, Knopf J, Maueroder C, Kienhofer D, Leppkes M, Herrmann M. Neutrophils and neutrophil extracellular traps orchestrate initiation and resolution of inflammation. *Clin Exp Rheumatol.* 2016;34(4 Suppl 98):6-8.
137. Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009;16(11):1438-44.

138. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18(9):1386-93.
139. Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS*. 2003;111(7-8):675-97.
140. Waisman A, Lukas D, Clausen BE, Yogev N. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance. *Semin Immunopathol*. 2017;39(2):153-63.
141. Segura E. Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subsets. *Methods Mol Biol*. 2016;1423:3-15.
142. Amigorena S. Dendritic Cells on the Way to Glory. *J Immunol*. 2018;200(3):885-6.
143. Bousso P. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):675-84.
144. Bar-On L, Birnberg T, Kim KW, Jung S. Dendritic cell-restricted CD80/86 deficiency results in peripheral regulatory T-cell reduction but is not associated with lymphocyte hyperactivation. *Eur J Immunol*. 2011;41(2):291-8.
145. Segura E, Amigorena S. Cross-Presentation in Mouse and Human Dendritic Cells. *Adv Immunol*. 2015;127:1-31.
146. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002;100(13):4512-20.
147. Subramanian M, Tabas I. Dendritic cells in atherosclerosis. *Semin Immunopathol*. 2014;36(1):93-102.
148. Mathan TS, Figdor CG, Buschow SI. Human plasmacytoid dendritic cells: from molecules to intercellular communication network. *Front Immunol*. 2013;4:372.
149. Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol*. 2012;13(12):1145-54.
150. Bachem A, Guttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, et al. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells. *J Exp Med*. 2010;207(6):1273-81.
151. Jongbloed SL, Kassianos AJ, McDonald KJ, Clark GJ, Ju X, Angel CE, et al. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med*. 2010;207(6):1247-60.
152. Sittig SP, Bakdash G, Weiden J, Skold AE, Tel J, Figdor CG, et al. A Comparative Study of the T Cell Stimulatory and Polarizing Capacity of Human Primary Blood Dendritic Cell Subsets. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:3605643.
153. Di Blasio S, Wortel IM, van Bladel DA, de Vries LE, Duiveman-de Boer T, Worah K, et al. Human CD1c(+) DCs are critical cellular mediators of immune responses induced by immunogenic cell death. *Oncoimmunology*. 2016;5(8):e1192739.
154. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. 2018;154(1):3-20.
155. Wilk AJ, Blish CA. Diversification of human NK cells: Lessons from deep profiling. *J Leukoc Biol*. 2018;103(4):629-41.
156. Geiger TL, Sun JC. Development and maturation of natural killer cells. *Curr Opin Immunol*. 2016;39:82-9.
157. Crouse J, Xu HC, Lang PA, Oxenius A. NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. *Trends Immunol*. 2015;36(1):49-58.

158. Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M, et al. Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol.* 2016;196(7):2923-31.
159. Nishikawa K, Saito S, Morii T, Hamada K, Ako H, Narita N, et al. Accumulation of CD16-CD56+ natural killer cells with high affinity interleukin 2 receptors in human early pregnancy decidua. *Int Immunol.* 1991;3(8):743-50.
160. Milush JM, Lopez-Verges S, York VA, Deeks SG, Martin JN, Hecht FM, et al. CD56negCD16(+) NK cells are activated mature NK cells with impaired effector function during HIV-1 infection. *Retrovirology.* 2013;10:158.
161. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* 2001;22(11):633-40.
162. Adams EJ, Chien YH, Garcia KC. Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22. *Science.* 2005;308(5719):227-31.
163. Savage PA, Boniface JJ, Davis MM. A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response. *Immunity.* 1999;10(4):485-92.
164. Kuhns MS, Davis MM, Garcia KC. Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity.* 2006;24(2):133-9.
165. Han P, Hodge G, Story C, Xu X. Phenotypic analysis of functional T-lymphocyte subtypes and natural killer cells in human cord blood: relevance to umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol.* 1995;89(4):733-40.
166. Koch AE, Robinson PG, Radosevich JA, Pope RM. Distribution of CD45RA and CD45RO T-lymphocyte subsets in rheumatoid arthritis synovial tissue. *J Clin Immunol.* 1990;10(4):192-9.
167. Yang S, Liu F, Wang QJ, Rosenberg SA, Morgan RA. The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. *PLoS One.* 2011;6(7):e22560.
168. Rea IM, McNerlan SE, Alexander HD. CD69, CD25, and HLA-DR activation antigen expression on CD3+ lymphocytes and relationship to serum TNF-alpha, IFN-gamma, and sIL-2R levels in aging. *Exp Gerontol.* 1999;34(1):79-93.
169. Filatova AY, Pylaeva EA, Potekhina AV, Osokina AK, Pogorelova OA, Tripoten MI, et al. [Subpopulation Composition of CD4+ T-lymphocytes as Factor Contributing to the Progression of Atherosclerosis of Carotid Arteries]. *Kardiologiya.* 2017;57(4):64-71.
170. Churina EG, Urazova OI, Novitskiy VV. The role of foxp3-expressing regulatory T cells and T helpers in immunopathogenesis of multidrug resistant pulmonary tuberculosis. *Tuberc Res Treat.* 2012;2012:931291.
171. Shresta S, Pham CT, Thomas DA, Graubert TA, Ley TJ. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol.* 1998;10(5):581-7.
172. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:221-41.
173. Colao A, Ferone D, Marzullo P, Panza N, Pivonello R, Orio F, Jr., et al. Lymphocyte subset pattern in acromegaly. *J Endocrinol Invest.* 2002;25(2):125-8.
174. Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011;366(1579):2748-55.
175. Pollay M. The function and structure of the cerebrospinal fluid outflow system. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2010;7:9.
176. Huff T, Tadi P, Varacallo M. Neuroanatomy, Cerebrospinal Fluid. *StatPearls. Treasure Island (FL)2019.*

177. Russi AE, Brown MA. The meninges: new therapeutic targets for multiple sclerosis. *Transl Res.* 2015;165(2):255-69.
178. Duan W, Zhang YP, Hou Z, Huang C, Zhu H, Zhang CQ, et al. Novel Insights into NeuN: from Neuronal Marker to Splicing Regulator. *Mol Neurobiol.* 2016;53(3):1637-47.
179. Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae.* 2015;7(2):42-7.
180. Obermeier B, Verma A, Ransohoff RM. The blood-brain barrier. *Handb Clin Neurol.* 2016;133:39-59.
181. Seo S, Kim H, Sung JH, Choi N, Lee K, Kim HN. Microphysiological systems for recapitulating physiology and function of blood-brain barrier. *Biomaterials.* 2019;232:119732.
182. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* 2013;19(12):1584-96.
183. Sakuma R, Kawahara M, Nakano-Doi A, Takahashi A, Tanaka Y, Narita A, et al. Brain pericytes serve as microglia-generating multipotent vascular stem cells following ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):57.
184. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol.* 2014;32:367-402.
185. Miyata M, Mandai K, Maruo T, Sato J, Shiotani H, Kaito A, et al. Localization of nectin-2delta at perivascular astrocytic endfoot processes and degeneration of astrocytes and neurons in nectin-2 knockout mouse brain. *Brain Res.* 2016;1649(Pt A):90-101.
186. Lannes N, Eppler E, Etemad S, Yotovskii P, Filgueira L. Microglia at center stage: a comprehensive review about the versatile and unique residential macrophages of the central nervous system. *Oncotarget.* 2017;8(69):114393-413.
187. Horng S, Therattil A, Moyon S, Gordon A, Kim K, Argaw AT, et al. Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *J Clin Invest.* 2017;127(8):3136-51.
188. Gu Y, Zheng G, Xu M, Li Y, Chen X, Zhu W, et al. Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *J Neurochem.* 2012;120(1):147-56.
189. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(1):a020412.
190. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature.* 2010;468(7321):232-43.
191. Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol.* 2016;37(9):608-20.
192. Parpura V, Verkhratsky A. Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signalling: evolution of the concept. *ASN Neuro.* 2012;4(4):201-5.
193. Oberheim NA, Goldman SA, Nedergaard M. Heterogeneity of astrocytic form and function. *Methods Mol Biol.* 2012;814:23-45.
194. Dossi E, Vasile F, Rouach N. Human astrocytes in the diseased brain. *Brain Res Bull.* 2018;136:139-56.
195. Kimelberg HK, Nedergaard M. Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurotherapeutics.* 2010;7(4):338-53.
196. Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C. Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *J Neurosci.* 2008;28(20):5207-17.
197. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci.* 2002;22(1):183-92.

198. Garwood CJ, Ratcliffe LE, Simpson JE, Heath PR, Ince PG, Wharton SB. Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017;43(4):281-98.
199. Kessaris N, Pringle N, Richardson WD. Specification of CNS glia from neural stem cells in the embryonic neuroepithelium. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008;363(1489):71-85.
200. Chung WS, Allen NJ, Eroglu C. Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(9):a020370.
201. Kuffler SW, Nicholls JG, Orkand RK. Physiological properties of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol.* 1966;29(4):768-87.
202. Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol.* 1966;29(4):788-806.
203. Belanger M, Magistretti PJ. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci.* 2009;11(3):281-95.
204. Anlauf E, Derouiche A. Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:144.
205. Kimelberg HK. Water homeostasis in the brain: basic concepts. *Neuroscience.* 2004;129(4):851-60.
206. Anderson MF, Blomstrand F, Blomstrand C, Eriksson PS, Nilsson M. Astrocytes and stroke: networking for survival? *Neurochem Res.* 2003;28(2):293-305.
207. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 2009;32(12):638-47.
208. Liddelow SA, Barres BA. Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity.* 2017;46(6):957-67.
209. Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017;541(7638):481-7.
210. Li T, Chen X, Zhang C, Zhang Y, Yao W. An update on reactive astrocytes in chronic pain. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):140.
211. Ben Haim L, Ceyzeriat K, Carrillo-de Sauvage MA, Aubry F, Auregan G, Guillemier M, et al. The JAK/STAT3 pathway is a common inducer of astrocyte reactivity in Alzheimer's and Huntington's diseases. *J Neurosci.* 2015;35(6):2817-29.
212. Ben Haim L, Carrillo-de Sauvage MA, Ceyzeriat K, Escartin C. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:278.
213. Zou LH, Shi YJ, He H, Jiang SM, Huo FF, Wang XM, et al. Effects of FGF2/FGFR1 Pathway on Expression of A1 Astrocytes After Infrasound Exposure. *Front Neurosci.* 2019;13:429.
214. Henrik Heiland D, Ravi VM, Behringer SP, Frenking JH, Wurm J, Joseph K, et al. Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat Commun.* 2019;10(1):2541.
215. Xu X, Zhang A, Zhu Y, He W, Di W, Fang Y, et al. MFG-E8 reverses microglial-induced neurotoxic astrocyte (A1) via NF-kappaB and PI3K-Akt pathways. *J Cell Physiol.* 2018;234(1):904-14.
216. Miller SJ. Astrocyte Heterogeneity in the Adult Central Nervous System. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:401.

217. Benarroch EE. Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology*. 2013;81(12):1079-88.
218. Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain. *Stroke*. 2001;32(5):1208-15.
219. Quick ED, Leser JS, Clarke P, Tyler KL. Activation of intrinsic immune responses and microglial phagocytosis in an ex vivo spinal cord slice culture model of West Nile virus infection. *J Virol*. 2014;88(22):13005-14.
220. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841-5.
221. ElAli A, Rivest S. Microglia Ontology and Signaling. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:72.
222. Gordon S, Pluddemann A. Tissue macrophages: heterogeneity and functions. *BMC Biol*. 2017;15(1):53.
223. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*. 2012;74(4):691-705.
224. Noda M, Doi Y, Liang J, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Takeuchi H, et al. Fractalkine attenuates excitotoxicity via microglial clearance of damaged neurons and antioxidant enzyme heme oxygenase-1 expression. *J Biol Chem*. 2011;286(3):2308-19.
225. Salter MW, Stevens B. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med*. 2017;23(9):1018-27.
226. Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron*. 2004;41(4):535-47.
227. Legroux L, Pittet CL, Beauseigle D, Deblois G, Prat A, Arbour N. An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytometry. *J Neurosci Methods*. 2015;247:23-31.
228. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol*. 2004;173(6):3916-24.
229. Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol*. 2005;175(7):4320-30.
230. Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. *J Leukoc Biol*. 2013;93(6):875-81.
231. Gottipati MK, Bekyarova E, Brenner M, Haddon RC, Parpura V. Changes in the morphology and proliferation of astrocytes induced by two modalities of chemically functionalized single-walled carbon nanotubes are differentially mediated by glial fibrillary acidic protein. *Nano Lett*. 2014;14(7):3720-7.
232. Schertz M, Mehdaoui H, Hamlat A, Piotin M, Banydeen R, Mejdoubi M. Incidence and Mortality of Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage in Martinique. *PLoS One*. 2016;11(5):e0155945.
233. Brathwaite S, Macdonald RL. Current management of delayed cerebral ischemia: update from results of recent clinical trials. *Transl Stroke Res*. 2014;5(2):207-26.
234. Kaura V, Bonner S. Subarachnoid haemorrhage: early clinical indicators and biomarkers. *Anesthesia and critical care*. 2012;5.

235. Passier PE, Visser-Meily JM, Rinkel GJ, Lindeman E, Post MW. Life satisfaction and return to work after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2011;20(4):324-9.
236. Dorsch NW. A review of cerebral vasospasm in aneurysmal subarachnoid haemorrhage Part III: Mechanisms of action of calcium antagonists. *J Clin Neurosci.* 1994;1(3):151-60.
237. Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke.* 1995;26(6):1086-91; discussion 91-2.
238. Sehba FA, Hou J, Pluta RM, Zhang JH. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Prog Neurobiol.* 2012;97(1):14-37.
239. Cahill J, Calvert JW, Marcantonio S, Zhang JH. p53 may play an orchestrating role in apoptotic cell death after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 2007;60(3):531-45; discussion 45.
240. Cahill J, Zhang JH. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction? *Stroke.* 2009;40(3 Suppl):S86-7.
241. Qian H, Dou Z, Ruan W, He P, Zhang JH, Yan F. ErbB4 Preserves Blood-Brain Barrier Integrity via the YAP/PIK3CB Pathway After Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Front Neurosci.* 2018;12:492.
242. Foreman B. The Pathophysiology of Delayed Cerebral Ischemia. *J Clin Neurophysiol.* 2016;33(3):174-82.
243. Macdonald RL. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(1):44-58.
244. Pluta RM, Hansen-Schwartz J, Dreier J, Vajkoczy P, Macdonald RL, Nishizawa S, et al. Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought. *Neurol Res.* 2009;31(2):151-8.
245. Grote E, Hassler W. The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 1988;22(4):654-61.
246. Wu H, Chen Z, Chen JZ, Pei LG, Xie J, Wei ZH, et al. High Mobility Group B-1 (HMGB-1) Promotes Apoptosis of Macrophage-Derived Foam Cells by Inducing Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(3):1019-29.
247. Macdonald RL, Weir BK. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke.* 1991;22(8):971-82.
248. Ayer R, Zhang J. Connecting the early brain injury of aneurysmal subarachnoid hemorrhage to clinical practice. *Turk Neurosurg.* 2010;20(2):159-66.
249. Claassen J, Carhuapoma JR, Kreiter KT, Du EY, Connolly ES, Mayer SA. Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: frequency, predictors, and impact on outcome. *Stroke.* 2002;33(5):1225-32.
250. Friedman JA, Pichelmann MA, Piepgras DG, McIver JI, Toussaint LG, 3rd, McClelland RL, et al. Pulmonary complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 2003;52(5):1025-31; discussion 31-2.
251. Naidech AM, Kreiter KT, Janjua N, Ostapkovich ND, Parra A, Commichau C, et al. Cardiac troponin elevation, cardiovascular morbidity, and outcome after subarachnoid hemorrhage. *Circulation.* 2005;112(18):2851-6.
252. Tam AK, Ilodigwe D, Mocco J, Mayer S, Kassell N, Ruefenacht D, et al. Impact of systemic inflammatory response syndrome on vasospasm, cerebral infarction, and outcome after

subarachnoid hemorrhage: exploratory analysis of CONSCIOUS-1 database. *Neurocrit Care*. 2010;13(2):182-9.

253. Dorsch NW. A review of cerebral vasospasm in aneurysmal subarachnoid haemorrhage Part II: Management. *J Clin Neurosci*. 1994;1(2):78-92.

254. Dorsch N. A clinical review of cerebral vasospasm and delayed ischaemia following aneurysm rupture. *Acta Neurochir Suppl*. 2011;110(Pt 1):5-6.

255. Reilly C, Amidei C, Tolentino J, Jahromi BS, Macdonald RL. Clot volume and clearance rate as independent predictors of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2004;101(2):255-61.

256. Mori T, Katayama Y, Kawamata T, Hirayama T. Improved efficiency of hypervolemic therapy with inhibition of natriuresis by fludrocortisone in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1999;91(6):947-52.

257. Hashi K, Takakura K, Sano K, Ohta T, Saito I, Okada K. [Intravenous hydrocortisone in large doses in the treatment of delayed ischemic neurological deficits following subarachnoid hemorrhage--results of a multi-center controlled double-blind clinical study]. *No To Shinkei*. 1988;40(4):373-82.

258. Lynch JR, Wang H, McGirt MJ, Floyd J, Friedman AH, Coon AL, et al. Simvastatin reduces vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a pilot randomized clinical trial. *Stroke*. 2005;36(9):2024-6.

259. Tseng MY, Czosnyka M, Richards H, Pickard JD, Kirkpatrick PJ. Effects of acute treatment with pravastatin on cerebral vasospasm, autoregulation, and delayed ischemic deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a phase II randomized placebo-controlled trial. *Stroke*. 2005;36(8):1627-32.

260. Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, Ruefenacht D, Schmiedek P, Weidauer S, et al. Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke*. 2008;39(11):3015-21.

261. Vajkoczy P, Meyer B, Weidauer S, Raabe A, Thome C, Ringel F, et al. Clazosentan (AXV-034343), a selective endothelin A receptor antagonist, in the prevention of cerebral vasospasm following severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase IIa study. *J Neurosurg*. 2005;103(1):9-17.

262. Chrissobolis S, Sobey CG. Recent evidence for an involvement of rho-kinase in cerebral vascular disease. *Stroke*. 2006;37(8):2174-80.

263. Mistry AM, Mistry EA, Ganesh Kumar N, Froehler MT, Fusco MR, Chitale RV. Corticosteroids in the Management of Hyponatremia, Hypovolemia, and Vasospasm in Subarachnoid Hemorrhage: A Meta-Analysis. *Cerebrovasc Dis*. 2016;42(3-4):263-71.

264. Shah K, Turgeon RD, Gooderham PA, Ensom MHH. Prevention and Treatment of Hyponatremia in Patients with Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review. *World Neurosurg*. 2018;109:222-9.

265. Celik O, Bilginer B, Korkmaz A, Gurgor PN, Bavbek M, Ozgen T, et al. Effects of intramuscular parecoxib administration on vasospasm in an experimental subarachnoid hemorrhage model. *Int J Neurosci*. 2011;121(6):316-22.

266. Mani BK, O'Dowd J, Kumar L, Brueggemann LI, Ross M, Byron KL. Vascular KCNQ (Kv7) potassium channels as common signaling intermediates and therapeutic targets in cerebral vasospasm. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013;61(1):51-62.

267. White RP, Robertson JT. Comparison of piroxicam, meclofenamate, ibuprofen, aspirin, and prostacyclin efficacy in a chronic model of cerebral vasospasm. *Neurosurgery*. 1983;12(1):40-6.
268. Handa Y, Hayashi M, Takeuchi H, Kobayashi H, Kawano H, Kabuto M. Effect of cyclosporine on the development of cerebral vasospasm in a primate model. *Neurosurgery*. 1991;28(3):380-5; discussion 5-6.
269. Kramer AH, Gurka MJ, Nathan B, Dumont AS, Kassell NF, Bleck TP. Statin use was not associated with less vasospasm or improved outcome after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2008;62(2):422-7; discussion 7-30.
270. McGirt MJ, Garces Ambrossi GL, Huang J, Tamargo RJ. Simvastatin for the prevention of symptomatic cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a single-institution prospective cohort study. *J Neurosurg*. 2009;110(5):968-74.
271. Mori T, Nagata K, Ishida T, Sasaki T, Nirei H, Hamada K, et al. FK-506: a new immunosuppressive agent, failed to reduce cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Vet Med Sci*. 1993;55(4):581-6.
272. Parra A, Kreiter KT, Williams S, Sciacca R, Mack WJ, Naidech AM, et al. Effect of prior statin use on functional outcome and delayed vasospasm after acute aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a matched controlled cohort study. *Neurosurgery*. 2005;56(3):476-84; discussion -84.
273. Peterson JW, Nishizawa S, Hackett JD, Bun T, Teramura A, Zervas NT. Cyclosporine A reduces cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in dogs. *Stroke*. 1990;21(1):133-7.
274. Sanchez-Pena P, Nouet A, Clarencon F, Colonne C, Jean B, Le Jean L, et al. Atorvastatin decreases computed tomography and S100-assessed brain ischemia after subarachnoid aneurysmal hemorrhage: a comparative study. *Crit Care Med*. 2012;40(2):594-602.
275. Vergouwen MD, Algra A, Rinkel GJ. Endothelin receptor antagonists for aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis update. *Stroke*. 2012;43(10):2671-6.
276. Francoeur CL, Mayer SA. Management of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Crit Care*. 2016;20(1):277.
277. Kazda S, Garthoff B, Krause HP, Schlossmann K. Cerebrovascular effects of the calcium antagonistic dihydropyridine derivative nimodipine in animal experiments. *Arzneimittelforschung*. 1982;32(4):331-8.
278. Petruk KC, West M, Mohr G, Weir BK, Benoit BG, Gentili F, et al. Nimodipine treatment in poor-grade aneurysm patients. Results of a multicenter double-blind placebo-controlled trial. *J Neurosurg*. 1988;68(4):505-17.
279. Dorhout Mees SM, Rinkel GJ, Feigin VL, Algra A, van den Bergh WM, Vermeulen M, et al. Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(3):CD000277.
280. Koliass AG, Sen J, Belli A. Pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: putative mechanisms and novel approaches. *J Neurosci Res*. 2009;87(1):1-11.
281. McMahon CJ, Hopkins S, Vail A, King AT, Smith D, Illingworth KJ, et al. Inflammation as a predictor for delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *J Neurointerv Surg*. 2013;5(6):512-7.

282. Ye ZN, Wu LY, Liu JP, Chen Q, Zhang XS, Lu Y, et al. Inhibition of leukotriene B4 synthesis protects against early brain injury possibly via reducing the neutrophil-generated inflammatory response and oxidative stress after subarachnoid hemorrhage in rats. *Behav Brain Res.* 2018;339:19-27.
283. Savarraj JPJ, Parsha K, Hergenroeder GW, Zhu L, Bajgur SS, Ahn S, et al. Systematic model of peripheral inflammation after subarachnoid hemorrhage. *Neurology.* 2017;88(16):1535-45.
284. Etminan N, Vergouwen MD, Ildigwe D, Macdonald RL. Effect of pharmaceutical treatment on vasospasm, delayed cerebral ischemia, and clinical outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(6):1443-51.
285. Sabri M, Jeon H, Ai J, Tariq A, Shang X, Chen G, et al. Anterior circulation mouse model of subarachnoid hemorrhage. *Brain Res.* 2009;1295:179-85.
286. Laplante P, Brillant-Marquis F, Brissette MJ, Joannette-Pilon B, Cayrol R, Kokta V, et al. MFG-E8 Reprogramming of Macrophages Promotes Wound Healing by Increased bFGF Production and Fibroblast Functions. *J Invest Dermatol.* 2017;137(9):2005-13.
287. Brissette MJ, Laplante P, Qi S, Latour M, Cailhier JF. Milk fat globule epidermal growth factor-8 limits tissue damage through inflammasome modulation during renal injury. *J Leukoc Biol.* 2016;100(5):1135-46.
288. Gris T, Laplante P, Thebault P, Cayrol R, Najjar A, Joannette-Pilon B, et al. Innate immunity activation in the early brain injury period following subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation.* 2019;16(1):253.
289. Aartsma-Rus A, van Putten M. Assessing functional performance in the mdx mouse model. *J Vis Exp.* 2014(85).
290. Brooks SP, Trueman RC, Dunnett SB. Assessment of Motor Coordination and Balance in Mice Using the Rotarod, Elevated Bridge, and Footprint Tests. *Curr Protoc Mouse Biol.* 2012;2(1):37-53.
291. Clements M, Gershenovich M, Chaber C, Campos-Rivera J, Du P, Zhang M, et al. Differential Ly6C Expression after Renal Ischemia-Reperfusion Identifies Unique Macrophage Populations. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(1):159-70.
292. Sabri M, Kawashima A, Ai J, Macdonald RL. Neuronal and astrocytic apoptosis after subarachnoid hemorrhage: a possible cause for poor prognosis. *Brain Res.* 2008;1238:163-71.
293. Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K, et al. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2018;49(3):e46-e110.
294. Karatayli E, Hall RA, Weber SN, Dooley S, Lammert F. Effect of alcohol on the interleukin 6-mediated inflammatory response in a new mouse model of acute-on-chronic liver injury. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2019;1865(2):298-307.
295. Ferreira BL, Ferreira ER, de Brito MV, Salu BR, Oliva MLV, Mortara RA, et al. BALB/c and C57BL/6 Mice Cytokine Responses to *Trypanosoma cruzi* Infection Are Independent of Parasite Strain Infectivity. *Front Microbiol.* 2018;9:553.
296. Fernandez-Arjona MDM, Grondona JM, Granados-Duran P, Fernandez-Llebrez P, Lopez-Avalos MD. Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:235.

297. He GL, Liu Y, Li M, Chen CH, Gao P, Yu ZP, et al. The amelioration of phagocytic ability in microglial cells by curcumin through the inhibition of EMF-induced pro-inflammatory responses. *J Neuroinflammation*. 2014;11:49.
298. Dorsch N, Branston NM, Symon L, Jakubowski J. Intracranial pressure changes following primate subarachnoid haemorrhage. *Neurol Res*. 1989;11(4):201-4.
299. Jakubowski J, Bell BA, Symon L, Zawirski MB, Francis DM. A primate model of subarachnoid hemorrhage: change in regional cerebral blood flow, autoregulation carbon dioxide reactivity, and central conduction time. *Stroke*. 1982;13(5):601-11.
300. Brawley BW, Strandness DE, Jr., Kelly WA. The biphasic response of cerebral vasospasm in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 1968;28(1):1-8.
301. Steiner L, Lofgren J, Zwetnow NN. Characteristics and limits of tolerance in repeated subarachnoid hemorrhage in dogs. *Acta Neurol Scand*. 1975;52(4):241-67.
302. Diringer MN, Kirsch JR, Hanley DF, Traystman RJ. Altered cerebrovascular CO₂ reactivity following subarachnoid hemorrhage in cats. *J Neurosurg*. 1993;78(6):915-21.
303. Backer-Grondahl A, Lindal S, Lorentzen MA, Eldevik P, Vorren T, Kristiansen B, et al. A new non-craniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the pig: a pilot study. *Lab Anim*. 2016;50(5):379-89.
304. Buhler D, Schuller K, Plesnila N. Protocol for the induction of subarachnoid hemorrhage in mice by perforation of the Circle of Willis with an endovascular filament. *Transl Stroke Res*. 2014;5(6):653-9.
305. Sehba FA, Pluta RM, Zhang JH. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury. *Mol Neurobiol*. 2011;43(1):27-40.
306. Espinosa F, Weir B, Overton T, Castor W, Grace M, Boisvert D. A randomized placebo-controlled double-blind trial of nimodipine after SAH in monkeys. Part 1: Clinical and radiological findings. *J Neurosurg*. 1984;60(6):1167-75.
307. Okada T, Harada T, Bark DH, Mayberg MR. A rat femoral artery model for vasospasm. *Neurosurgery*. 1990;27(3):349-56.
308. Megyesi JF, Vollrath B, Cook DA, Findlay JM. In vivo animal models of cerebral vasospasm: a review. *Neurosurgery*. 2000;46(2):448-60; discussion 60-1.
309. Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Leach A. Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1994;25(7):1342-7.
310. Sehba FA, Pluta RM. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage models: do they need a fix? *Stroke Res Treat*. 2013;2013:615154.
311. Xu W, Li T, Gao L, Zheng J, Yan J, Zhang J, et al. Apelin-13/APJ system attenuates early brain injury via suppression of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation and oxidative stress in a AMPK-dependent manner after subarachnoid hemorrhage in rats. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):247.
312. Liu FY, Cai J, Wang C, Ruan W, Guan GP, Pan HZ, et al. Fluoxetine attenuates neuroinflammation in early brain injury after subarachnoid hemorrhage: a possible role for the regulation of TLR4/MyD88/NF-kappaB signaling pathway. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):347.
313. Pu T, Zou W, Feng W, Zhang Y, Wang L, Wang H, et al. Persistent Malfunction of Glymphatic and Meningeal Lymphatic Drainage in a Mouse Model of Subarachnoid Hemorrhage. *Exp Neurobiol*. 2019;28(1):104-18.

314. Ahn SH, Savarraj JPJ, Parsha K, Hergenroeder GW, Chang TR, Kim DH, et al. Inflammation in delayed ischemia and functional outcomes after subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):213.
315. Chamling B, Gross S, Stoffel-Wagner B, Schubert GA, Clusmann H, Coburn M, et al. Early Diagnosis of Delayed Cerebral Ischemia: Possible Relevance for Inflammatory Biomarkers in Routine Clinical Practice? *World Neurosurg*. 2017;104:152-7.
316. Steward O, Balice-Gordon R. Rigor or mortis: best practices for preclinical research in neuroscience. *Neuron*. 2014;84(3):572-81.
317. de Oliveira Manoel AL, Goffi A, Marotta TR, Schweizer TA, Abrahamson S, Macdonald RL. The critical care management of poor-grade subarachnoid haemorrhage. *Crit Care*. 2016;20:21.
318. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1254-66.
319. Iyer SS, Cheng G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit Rev Immunol*. 2012;32(1):23-63.
320. Iseda K, Ono S, Onoda K, Satoh M, Manabe H, Nishiguchi M, et al. Antivasospastic and antiinflammatory effects of caspase inhibitor in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2007;107(1):128-35.
321. Ma L, Jiang Y, Dong Y, Gao J, Du B, Liu D. Anti-TNF-alpha antibody attenuates subarachnoid hemorrhage-induced apoptosis in the hypothalamus by inhibiting the activation of Erk. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2018;14:525-36.
322. Friedrich V, Flores R, Muller A, Bi W, Peerschke EI, Sehba FA. Reduction of neutrophil activity decreases early microvascular injury after subarachnoid haemorrhage. *J Neuroinflammation*. 2011;8:103.
323. Banks WA. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(4):275-92.
324. Hanafy KA. The role of microglia and the TLR4 pathway in neuronal apoptosis and vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation*. 2013;10:83.
325. Chaichana KL, Pradilla G, Huang J, Tamargo RJ. Role of inflammation (leukocyte-endothelial cell interactions) in vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *World Neurosurg*. 2010;73(1):22-41.
326. Peeyush Kumar T, McBride DW, Dash PK, Matsumura K, Rubi A, Blackburn SL. Endothelial Cell Dysfunction and Injury in Subarachnoid Hemorrhage. *Mol Neurobiol*. 2019;56(3):1992-2006.
327. Provencio JJ, Fu X, Siu A, Rasmussen PA, Hazen SL, Ransohoff RM. CSF neutrophils are implicated in the development of vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2010;12(2):244-51.
328. Provencio JJ, Altay T, Smithason S, Moore SK, Ransohoff RM. Depletion of Ly6G/C(+) cells ameliorates delayed cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *J Neuroimmunol*. 2011;232(1-2):94-100.
329. Drummond RA. Neuro-Immune Mechanisms of Anti-Cryptococcal Protection. *J Fungi (Basel)*. 2017;4(1).
330. Dougherty KD, Dreyfus CF, Black IB. Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Dis*. 2000;7(6 Pt B):574-85.

331. Teismann P, Schulz JB. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell Tissue Res.* 2004;318(1):149-61.
332. Minagar A, Shapshak P, Fujimura R, Ownby R, Heyes M, Eisdorfer C. The role of macrophage/microglia and astrocytes in the pathogenesis of three neurologic disorders: HIV-associated dementia, Alzheimer disease, and multiple sclerosis. *J Neurol Sci.* 2002;202(1-2):13-23.
333. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005;8(6):752-8.
334. Rothhammer V, Borucki DM, Tjon EC, Takenaka MC, Chao CC, Ardura-Fabregat A, et al. Microglial control of astrocytes in response to microbial metabolites. *Nature.* 2018;557(7707):724-8.
335. Yokota M, Peterson JW, Tani E, Yamaura I. The immunohistochemical distribution of protein kinase C isozymes is altered in the canine brain and basilar artery after subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Lett.* 1994;180(2):171-4.
336. Murakami K, Koide M, Dumont TM, Russell SR, Tranmer BI, Wellman GC. Subarachnoid Hemorrhage Induces Gliosis and Increased Expression of the Pro-inflammatory Cytokine High Mobility Group Box 1 Protein. *Transl Stroke Res.* 2011;2(1):72-9.
337. Zheng VZ, Wong GKC. Neuroinflammation responses after subarachnoid hemorrhage: A review. *J Clin Neurosci.* 2017;42:7-11.
338. You W, Wang Z, Li H, Shen H, Xu X, Jia G, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin attenuates early brain injury through modulating microglial polarization after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *J Neurol Sci.* 2016;367:224-31.
339. Schneider UC, Davids AM, Brandenburg S, Muller A, Elke A, Magrini S, et al. Microglia inflict delayed brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neuropathol.* 2015;130(2):215-31.
340. Brown GC, Neher JJ. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(4):209-16.
341. Vilalta A, Brown GC. Neurophagy, the phagocytosis of live neurons and synapses by glia, contributes to brain development and disease. *FEBS J.* 2018;285(19):3566-75.
342. Neher JJ, Neniskyte U, Zhao JW, Bal-Price A, Tolkovsky AM, Brown GC. Inhibition of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *J Immunol.* 2011;186(8):4973-83.
343. Yao X, Liu S, Ding W, Yue P, Jiang Q, Zhao M, et al. TLR4 signal ablation attenuated neurological deficits by regulating microglial M1/M2 phenotype after traumatic brain injury in mice. *J Neuroimmunol.* 2017;310:38-45.
344. Pan J, Jin JL, Ge HM, Yin KL, Chen X, Han LJ, et al. Malibatol A regulates microglia M1/M2 polarization in experimental stroke in a PPARgamma-dependent manner. *J Neuroinflammation.* 2015;12:51.
345. Liu X, Liu J, Zhao S, Zhang H, Cai W, Cai M, et al. Interleukin-4 Is Essential for Microglia/Macrophage M2 Polarization and Long-Term Recovery After Cerebral Ischemia. *Stroke.* 2016;47(2):498-504.
346. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2016;53(2):1181-94.
347. Kumar A, Loane DJ. Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun.* 2012;26(8):1191-201.

348. Biswas S, Bachay G, Chu J, Hunter DD, Brunken WJ. Laminin-Dependent Interaction between Astrocytes and Microglia: A Role in Retinal Angiogenesis. *Am J Pathol.* 2017.
349. Kubota T, Handa Y, Tsuchida A, Kaneko M, Kobayashi H, Kubota T. The kinetics of lymphocyte subsets and macrophages in subarachnoid space after subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke.* 1993;24(12):1993-2000; discussion -1.
350. Nau R, Haase S, Bunkowski S, Bruck W. Neuronal apoptosis in the dentate gyrus in humans with subarachnoid hemorrhage and cerebral hypoxia. *Brain Pathol.* 2002;12(3):329-36.
351. Prunell GF, Svendgaard NA, Alkass K, Mathiesen T. Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain. *J Neurosurg.* 2005;102(6):1046-54.
352. Li H, Yu JS, Zhang HS, Yang YQ, Huang LT, Zhang DD, et al. Increased Expression of Caspase-12 After Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Neurochem Res.* 2016;41(12):3407-16.
353. Liu F, Chen Y, Hu Q, Li B, Tang J, He Y, et al. MFGE8/Integrin beta3 pathway alleviates apoptosis and inflammation in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Exp Neurol.* 2015;272:120-7.
354. Prunell GF, Mathiesen T, Diemer NH, Svendgaard NA. Experimental subarachnoid hemorrhage: subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models. *Neurosurgery.* 2003;52(1):165-75; discussion 75-6.
355. Dreier JP, Ebert N, Priller J, Megow D, Lindauer U, Klee R, et al. Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *J Neurosurg.* 2000;93(4):658-66.
356. Hernandez-Jimenez M, Pena-Martinez C, Godino MDC, Diaz-Guzman J, Moro MA, Lizasoain I. Test repositioning for functional assessment of neurological outcome after experimental stroke in mice. *PLoS One.* 2017;12(5):e0176770.
357. Hoffman E, Winder S, . A modified wire hanging apparatus for small animal muscle function testing. *PLOS Currents muscular Dystrophy.* 2016;Edition 1.
358. Chen S, Feng H, Sherchan P, Klebe D, Zhao G, Sun X, et al. Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage. *Prog Neurobiol.* 2014;115:64-91.
359. Al-Tamimi YZ, Bhargava D, Orsi NM, Teraifi A, Cummings M, Ekbote UV, et al. Compartmentalisation of the inflammatory response following aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cytokine.* 2019;123:154778.
360. Muroi C, Hugelshofer M, Seule M, Tastan I, Fujioka M, Mishima K, et al. Correlation among systemic inflammatory parameter, occurrence of delayed neurological deficits, and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 2013;72(3):367-75; discussion 75.
361. Lenski M, Hüge V, Briegel J, Tonn JC, Schichor C, Thon N. Interleukin 6 in the Cerebrospinal Fluid as a Biomarker for Onset of Vasospasm and Ventriculitis After Severe Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg.* 2017;99:132-9.
362. Nguyen V, Mendelsohn A, Larrick JW. Interleukin-7 and Immunosenescence. *J Immunol Res.* 2017;2017:4807853.
363. Zhu J, Zhang W, Zhang L, Xu L, Chen X, Zhou S, et al. IL-7 suppresses macrophage autophagy and promotes liver pathology in *Schistosoma japonicum*-infected mice. *J Cell Mol Med.* 2018;22(7):3353-63.

364. Huang Y, Du KL, Guo PY, Zhao RM, Wang B, Zhao XL, et al. IL-16 regulates macrophage polarization as a target gene of mir-145-3p. *Mol Immunol.* 2019;107:1-9.
365. Ahearne CE, Chang RY, Walsh BH, Boylan GB, Murray DM. Cord Blood IL-16 Is Associated with 3-Year Neurodevelopmental Outcomes in Perinatal Asphyxia and Hypoxic-Ischaemic Encephalopathy. *Dev Neurosci.* 2017;39(1-4):59-65.
366. Sun L, Ye RD. Serum amyloid A1: Structure, function and gene polymorphism. *Gene.* 2016;583(1):48-57.
367. Yu N, Zhang S, Lu J, Li Y, Yi X, Tang L, et al. Serum amyloid A, an acute phase protein, stimulates proliferative and proinflammatory responses of keratinocytes. *Cell Prolif.* 2017;50(3).
368. Azurmendi L, Degos V, Tiberti N, Kapandji N, Sanchez P, Sarrafzadeh A, et al. Measuring Serum Amyloid A for Infection Prediction in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *J Proteome Res.* 2015;14(9):3948-56.
369. Kaynar MY, Tanriverdi T, Kafadar AM, Kacira T, Uzun H, Aydin S, et al. Detection of soluble intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in both cerebrospinal fluid and serum of patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 2004;101(6):1030-6.
370. Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 1995;37(4):424-35.
371. Frijns CJ, Kappelle LJ, van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. *Stroke.* 1997;28(11):2214-8.
372. Handa Y, Kubota T, Kaneko M, Tsuchida A, Kobayashi H, Kawano H, et al. Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on the cerebral artery following subarachnoid haemorrhage in rats. *Acta Neurochir (Wien).* 1995;132(1-3):92-7.
373. Sills AK, Jr., Clatterbuck RE, Thompson RC, Cohen PL, Tamargo RJ. Endothelial cell expression of intercellular adhesion molecule 1 in experimental posthemorrhagic vasospasm. *Neurosurgery.* 1997;41(2):453-60; discussion 60-1.
374. Rothoerl RD, Schebesch KM, Kubitz M, Woertgen C, Brawanski A, Pina AL. ICAM-1 and VCAM-1 expression following aneurysmal subarachnoid hemorrhage and their possible role in the pathophysiology of subsequent ischemic deficits. *Cerebrovasc Dis.* 2006;22(2-3):143-9.
375. Al-Drawi AS, Wicinski M, Grzesk G, Szadujkis-Szadurska K, Grzesk E, Weclawicz MM, et al. Evaluation of VCAM-1 and ICAM-1 concentration and values of global tests concerning the coagulation system of patients suffering from subarachnoid haemorrhage. *Ann Agric Environ Med.* 2016;23(4):654-9.
376. Tau G, Rothman P. Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy.* 1999;54(12):1233-51.
377. Taylor S, Mehina E, White E, Reeson P, Yongblah K, Doyle KP, et al. Suppressing Interferon-gamma Stimulates Microglial Responses and Repair of Microbleeds in the Diabetic Brain. *J Neurosci.* 2018;38(40):8707-22.
378. Rahman MT, Ghosh C, Hossain M, Linfield D, Rezaee F, Janigro D, et al. IFN-gamma, IL-17A, or zonulin rapidly increase the permeability of the blood-brain and small intestinal epithelial barriers: Relevance for neuro-inflammatory diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;507(1-4):274-9.

379. Schoch HJ, Fischer S, Marti HH. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain*. 2002;125(Pt 11):2549-57.
380. Liu L, Fujimoto M, Kawakita F, Nakano F, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, et al. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment Suppresses Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Mol Neurobiol*. 2016;53(7):4529-38.
381. Liu L, Fujimoto M, Kawakita F, Ichikawa N, Suzuki H. Vascular Endothelial Growth Factor in Brain Edema Formation After Subarachnoid Hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*. 2016;121:173-7.
382. Scheufler KM, Dreves J, van Velthoven V, Reusch P, Klisch J, Augustin HG, et al. Implications of vascular endothelial growth factor, sFlt-1, and sTie-2 in plasma, serum and cerebrospinal fluid during cerebral ischemia in man. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(1):99-110.
383. Temple S, Qian X. bFGF, neurotrophins, and the control of cortical neurogenesis. *Neuron*. 1995;15(2):249-52.
384. Shao X, Hu Q, Chen S, Wang Q, Xu P, Jiang X. Ghrelin Ameliorates Traumatic Brain Injury by Down-Regulating bFGF and FGF-BP. *Front Neurosci*. 2018;12:445.
385. Ogane K, Wolf EW, Robertson JH. Role of basic fibroblast growth factor in the course of cerebral vasospasm in an experimental model of subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res*. 2002;24(4):365-72.
386. Potteaux S, Combadiere C, Esposito B, Lecureuil C, Ait-Oufella H, Merval R, et al. Role of bone marrow-derived CC-chemokine receptor 5 in the development of atherosclerosis of low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(8):1858-63.
387. Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, et al. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med*. 2009;15(8):946-50.
388. Bartholomaeus I, Kawakami N, Odoardi F, Schlager C, Miljkovic D, Ellwart JW, et al. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature*. 2009;462(7269):94-8.
389. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-26.
390. Lu H, Shi JX, Chen HL, Hang CH, Wang HD, Yin HX. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in the cerebral artery after experimental subarachnoid hemorrhage. *Brain Res*. 2009;1262:73-80.
391. Che X, Ye W, Panga L, Wu DC, Yang GY. Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res*. 2001;902(2):171-7.
392. Daly C, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation*. 2003;10(3-4):247-57.
393. Niwa A, Osuka K, Nakura T, Matsuo N, Watabe T, Takayasu M. Interleukin-6, MCP-1, IP-10, and MIG are sequentially expressed in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):217.
394. Di Battista AP, Churchill N, Schweizer TA, Rhind SG, Richards D, Baker AJ, et al. Blood biomarkers are associated with brain function and blood flow following sport concussion. *J Neuroimmunol*. 2018;319:1-8.

395. Di Battista AP, Rhind SG, Richards D, Churchill N, Baker AJ, Hutchison MG. Altered Blood Biomarker Profiles in Athletes with a History of Repetitive Head Impacts. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159929.
396. Buonora JE, Yarnell AM, Lazarus RC, Mousseau M, Latour LL, Rizoli SB, et al. Multivariate analysis of traumatic brain injury: development of an assessment score. *Front Neurol*. 2015;6:68.
397. Shultz SR, Bao F, Omana V, Chiu C, Brown A, Cain DP. Repeated mild lateral fluid percussion brain injury in the rat causes cumulative long-term behavioral impairments, neuroinflammation, and cortical loss in an animal model of repeated concussion. *J Neurotrauma*. 2012;29(2):281-94.
398. Breland UM, Michelsen AE, Skjelland M, Folkersen L, Krohg-Sorensen K, Russell D, et al. Raised MCP-4 levels in symptomatic carotid atherosclerosis: an inflammatory link between platelet and monocyte activation. *Cardiovasc Res*. 2010;86(2):265-73.
399. Croxford AL, Kulig P, Becher B. IL-12-and IL-23 in health and disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014;25(4):415-21.
400. Cooper AM, Khader SA. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol*. 2007;28(1):33-8.
401. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003;421(6924):744-8.
402. Gran B, Chu N, Zhang GX, Yu S, Li Y, Chen XH, et al. Early administration of IL-12 suppresses EAE through induction of interferon-gamma. *J Neuroimmunol*. 2004;156(1-2):123-31.
403. Sun L, He C, Nair L, Yeung J, Egwuagu CE. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. *Cytokine*. 2015;75(2):249-55.
404. Parikh SM. Angiopoietins and Tie2 in vascular inflammation. *Curr Opin Hematol*. 2017;24(5):432-8.
405. Chittiboina P, Ganta V, Monceaux CP, Scott LK, Nanda A, Alexander JS. Angiopoietins as promising biomarkers and potential therapeutic targets in brain injury. *Pathophysiology*. 2013;20(1):15-21.
406. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996;87(7):1161-9.
407. Wang Y, Tian Y, Wang D, Wei H, Zhao Z, Jiang R, et al. High Angiopoietin-1 levels predict a good functional outcome within 72 h of an aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A prospective study from a single center. *J Neurol Sci*. 2015;356(1-2):72-6.
408. Rasmussen R, Bache S, Stavngaard T, Moller K. Plasma Levels of IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1, VCAM-1, IFNgamma, and TNFalpha are not Associated with Delayed Cerebral Ischemia, Cerebral Vasospasm, or Clinical Outcome in Patients with Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg*. 2019.
409. Jinushi M, Sato M, Kanamoto A, Itoh A, Nagai S, Koyasu S, et al. Milk fat globule epidermal growth factor-8 blockade triggers tumor destruction through coordinated cell-autonomous and immune-mediated mechanisms. *J Exp Med*. 2009;206(6):1317-26.

410. Upadhyaya B, Yin Y, Hill BJ, Douek DC, Prussin C. Hierarchical IL-5 expression defines a subpopulation of highly differentiated human Th2 cells. *J Immunol.* 2011;187(6):3111-20.
411. Aziz M, Yang WL, Corbo LM, Chaung WW, Matsuo S, Wang P. MFG-E8 inhibits neutrophil migration through alphavbeta(3)-integrin-dependent MAP kinase activation. *Int J Mol Med.* 2015;36(1):18-28.
412. Aziz M, Matsuda A, Yang WL, Jacob A, Wang P. Milk fat globule-epidermal growth factor-factor 8 attenuates neutrophil infiltration in acute lung injury via modulation of CXCR2. *J Immunol.* 2012;189(1):393-402.
413. Yamada K, Uchiyama A, Uehara A, Perera B, Ogino S, Yokoyama Y, et al. MFG-E8 Drives Melanoma Growth by Stimulating Mesenchymal Stromal Cell-Induced Angiogenesis and M2 Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Cancer Res.* 2016;76(14):4283-92.
414. Bok S, Kim YE, Woo Y, Kim S, Kang SJ, Lee Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates microglial functions affecting neuronal survival in the acute phase of ischemic stroke in mice. *Oncotarget.* 2017;8(67):111508-21.
415. Cheyuo C, Aziz M, Wang P. Neurogenesis in Neurodegenerative Diseases: Role of MFG-E8. *Front Neurosci.* 2019;13:569.
416. Uchiyama A, Motegi SI, Sekiguchi A, Fujiwara C, Perera B, Ogino S, et al. Mesenchymal stem cells-derived MFG-E8 accelerates diabetic cutaneous wound healing. *J Dermatol Sci.* 2017;86(3):187-97.
417. Uchiyama A, Yamada K, Perera B, Ogino S, Yokoyama Y, Takeuchi Y, et al. Protective effect of MFG-E8 after cutaneous ischemia-reperfusion injury. *J Invest Dermatol.* 2015;135(4):1157-65.
418. Li E, Noda M, Doi Y, Parajuli B, Kawanokuchi J, Sonobe Y, et al. The neuroprotective effects of milk fat globule-EGF factor 8 against oligomeric amyloid beta toxicity. *J Neuroinflammation.* 2012;9:148.
419. Liu F, Hu Q, Li B, Manaenko A, Chen Y, Tang J, et al. Recombinant milk fat globule-EGF factor-8 reduces oxidative stress via integrin beta3/nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase pathway in subarachnoid hemorrhage rats. *Stroke.* 2014;45(12):3691-7.
420. Marcolini E, Hine J. Approach to the Diagnosis and Management of Subarachnoid Hemorrhage. *West J Emerg Med.* 2019;20(2):203-11.
421. Falborg L, Waehrens LN, Alsner J, Bluhme H, Frokiaer J, Heegaard CW, et al. Biodistribution of 99mTc-HYNIC-lactadherin in mice--a potential tracer for visualizing apoptosis in vivo. *Scand J Clin Lab Invest.* 2010;70(3):209-16.
422. Miner NA, Koehler J, Greenaway L. Intraperitoneal injection of mice. *Appl Microbiol.* 1969;17(2):250-1.
423. Poulsen RH, Rasmussen JT, Ejlersen JA, Flo C, Falborg L, Heegaard CW, et al. Pharmacokinetics of the phosphatidylserine tracers 99mTc-lactadherin and 99mTc-annexin V in pigs. *EJNMMI Res.* 2013;3(1):15.
424. Zheng ZV, Lyu H, Lam SYE, Lam PK, Poon WS, Wong GKC. The Dynamics of Microglial Polarization Reveal the Resident Neuroinflammatory Responses After Subarachnoid Hemorrhage. *Transl Stroke Res.* 2019.
425. Savarraj J, Parsha K, Hergenroeder G, Ahn S, Chang TR, Kim DH, et al. Early Brain Injury Associated with Systemic Inflammation After Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit Care.* 2018;28(2):203-11.

426. Al-Mufti F, Misiolak KA, Roh D, Alawi A, Bauerschmidt A, Park S, et al. White Blood Cell Count Improves Prediction of Delayed Cerebral Ischemia Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Neurosurgery*. 2019;84(2):397-403.
427. Zhao H, Li ST, Zhu J, Hua XM, Wan L. Analysis of Peripheral Blood Cells' Transcriptome in Patients With Subarachnoid Hemorrhage From Ruptured Aneurysm Reveals Potential Biomarkers. *World Neurosurg*. 2019;129:e16-e22.
428. Rass V, Gaasch M, Kofler M, Schiefecker AJ, Ianosi BA, Rhomberg P, et al. Systemic Inflammatory Response Syndrome as Predictor of Poor Outcome in Nontraumatic Subarachnoid Hemorrhage Patients. *Crit Care Med*. 2018;46(12):e1152-e9.
429. Zhou Y, Jiang Y, Peng Y, Zhang M. The Quantitative and Functional Changes of Postoperative Peripheral Blood Immune Cell Subsets Relate to Prognosis of Patients with Subarachnoid Hemorrhage: A Preliminary Study. *World Neurosurg*. 2017;108:206-15.
430. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*. 2001;193(11):1303-10.
431. Moraes L, Grille S, Morelli P, Mila R, Trias N, Brugnini A, et al. Immune cells subpopulations in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Springerplus*. 2015;4:195.
432. Adib Rad H, Basirat Z, Mostafazadeh A, Faramarzi M, Bijani A, Nouri HR, et al. Evaluation of peripheral blood NK cell subsets and cytokines in unexplained recurrent miscarriage. *J Chin Med Assoc*. 2018;81(12):1065-70.
433. Sarrafzadeh A, Schlenk F, Meisel A, Dreier J, Vajkoczy P, Meisel C. Immunodepression after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2011;42(1):53-8.
434. Dziedzic T, Slowik A, Szczudlik A. Nosocomial infections and immunity: lesson from brain-injured patients. *Crit Care*. 2004;8(4):266-70.
435. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(10):775-86.
436. Korostynski M, Piechota M, Morga R, Hoinkis D, Golda S, Zygmunt M, et al. Systemic response to rupture of intracranial aneurysms involves expression of specific gene isoforms. *J Transl Med*. 2019;17(1):141.
437. Prass K, Meisel C, Hoflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, et al. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J Exp Med*. 2003;198(5):725-36.
438. Kenney MJ, Ganta CK. Autonomic nervous system and immune system interactions. *Compr Physiol*. 2014;4(3):1177-200.
439. Shi K, Wood K, Shi FD, Wang X, Liu Q. Stroke-induced immunosuppression and poststroke infection. *Stroke Vasc Neurol*. 2018;3(1):34-41.
440. Puchner A, Saferding V, Bonelli M, Mikami Y, Hofmann M, Brunner JS, et al. Non-classical monocytes as mediators of tissue destruction in arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(10):1490-7.
441. Zimmermann HW, Seidler S, Nattermann J, Gassler N, Hellerbrand C, Zerneck A, et al. Functional contribution of elevated circulating and hepatic non-classical CD14CD16 monocytes to inflammation and human liver fibrosis. *PLoS One*. 2010;5(6):e11049.

442. Mohme M, Sauvigny T, Mader MM, Schweingruber N, Maire CL, Runger A, et al. Immune Characterization in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage Reveals Distinct Monocytic Activation and Chemokine Patterns. *Transl Stroke Res*. 2019.
443. Hamdan A, Barnes J, Mitchell P. Subarachnoid hemorrhage and the female sex: analysis of risk factors, aneurysm characteristics, and outcomes. *J Neurosurg*. 2014;121(6):1367-73.
444. Duijghuisen JJ, Greebe P, Nieuwkamp DJ, Algra A, Rinkel GJ. Sex-Related Differences in Outcome in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2016;25(8):2067-70.
445. Lanzino G, Kassell NF, Germanson TP, Kongable GL, Truskowski LL, Torner JC, et al. Age and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: why do older patients fare worse? *J Neurosurg*. 1996;85(3):410-8.
446. Chotai S, Ahn SY, Moon HJ, Kim JH, Chung HS, Chung YG, et al. Prediction of outcomes in young adults with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2013;53(3):157-62.
447. Friedrich V, Bederson JB, Sehba FA. Gender influences the initial impact of subarachnoid hemorrhage: an experimental investigation. *PLoS One*. 2013;8(11):e80101.
448. Barrow JW, Turan N, Wangmo P, Roy AK, Pradilla G. The role of inflammation and potential use of sex steroids in intracranial aneurysms and subarachnoid hemorrhage. *Surg Neurol Int*. 2018;9:150.
449. Ding D, Starke RM, Dumont AS, Owens GK, Hasan DM, Chalouhi N, et al. Therapeutic implications of estrogen for cerebral vasospasm and delayed cerebral ischemia induced by aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Biomed Res Int*. 2014;2014:727428.
450. Lin CL, Shih HC, Dumont AS, Kassell NF, Lieu AS, Su YF, et al. The effect of 17beta-estradiol in attenuating experimental subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. *J Neurosurg*. 2006;104(2):298-304.
451. Rattanajarasoj S, Unchern S. Comparable attenuation of Abeta(25-35)-induced neurotoxicity by quercitrin and 17beta-estradiol in cultured rat hippocampal neurons. *Neurochem Res*. 2010;35(8):1196-205.
452. Bruce-Keller AJ, Keeling JL, Keller JN, Huang FF, Camondola S, Mattson MP. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology*. 2000;141(10):3646-56.
453. Sun X, Ji C, Hu T, Wang Z, Chen G. Tamoxifen as an effective neuroprotectant against early brain injury and learning deficits induced by subarachnoid hemorrhage: possible involvement of inflammatory signaling. *J Neuroinflammation*. 2013;10:157.
454. Chang CM, Su YF, Chang CZ, Chung CL, Tsai YJ, Loh JK, et al. Progesterone attenuates experimental subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm by upregulation of endothelial nitric oxide synthase via Akt signaling pathway. *Biomed Res Int*. 2014;2014:207616.
455. Wang Z, Zuo G, Shi XY, Zhang J, Fang Q, Chen G. Progesterone administration modulates cortical TLR4/NF-kappaB signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in male rats. *Mediators Inflamm*. 2011;2011:848309.
456. Yan F, Hu Q, Chen J, Wu C, Gu C, Chen G. Progesterone attenuates early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. *Neurosci Lett*. 2013;543:163-7.
457. Zhao XD, Zhou YT. Effects of progesterone on intestinal inflammatory response and mucosa structure alterations following SAH in male rats. *J Surg Res*. 2011;171(1):e47-53.

458. Stein DG. Embracing failure: What the Phase III progesterone studies can teach about TBI clinical trials. *Brain Inj.* 2015;29(11):1259-72.
459. Pike CJ. Testosterone attenuates beta-amyloid toxicity in cultured hippocampal neurons. *Brain Res.* 2001;919(1):160-5.
460. Gurer B, Turkoglu E, Kertmen H, Karavelioglu E, Arikok AT, Sekerci Z. Attenuation of cerebral vasospasm and secondary injury by testosterone following experimental subarachnoid hemorrhage in rabbit. *Acta Neurochir (Wien)*. 2014;156(11):2111-20; discussion 20.
461. Uchida M, Palmateer JM, Herson PS, DeVries AC, Cheng J, Hurn PD. Dose-dependent effects of androgens on outcome after focal cerebral ischemia in adult male mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2009;29(8):1454-62.
462. Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:619-43.