

Académie d'Orléans –Tours
Université François-Rabelais

FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

Année 2012

N°

Thèse

Pour le

DOCTORAT EN MEDECINE

Diplôme d'Etat

Par

GUERREIRO QUILICHINI Julie
Née le 21 décembre 1982 à Orléans (45)

Présentée et soutenue publiquement le 14 mai 2012

EFFET DE LA PROSTAGLANDINE E2 SUR LA MATURATION
OLIGODENDROCYTAIRE *IN VITRO*

Jury

Président de Jury : Monsieur le Professeur Elie SALIBA
Membres du jury : Monsieur le Professeur Christian ANDRES
Monsieur le Professeur Pierre THOMAS-CASTELNAU
Madame le Docteur Géraldine FAVRAIS

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
FACULTE DE MEDECINE DE TOURS

DOYEN

Professeur Dominique PERROTIN

VICE-DOYEN

Professeur Daniel ALISON

ASSESEURS

Professeur Christian ANDRES, Recherche
Docteur Brigitte ARBEILLE, Moyens
Professeur Christian BINET, Formation Médicale Continue
Professeur Laurent BRUNEREAU, Pédagogie
Professeur Patrice DIOT, Recherche clinique

SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – 1962-1966
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- 1966-1972
Professeur André GOUAZÉ - 1972-1994
Professeur Jean-Claude ROLLAND – 1994-2004

PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET
Professeur Jean-Claude BESNARD
Professeur Patrick CHOUTET
Professeur Guy GINIES
Professeur Olivier LE FLOCH
Professeur Chantal MAURAGE
Professeur Léandre POURCELOT
Professeur Michel ROBERT
Professeur Jean-Claude ROLLAND

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. Ph. ANTHONIOZ - A. AUDURIER – Ph. BAGROS - G. BALLON – P.BARDOS - J. BARSOTTI
A. BENATRE - Ch. BERGER –J. BRIZON - Mme M. BROCHIER - Ph. BURDIN - L. CASTELLANI
J.P. FAUCHIER - B. GRENIER – M. JAN –P. JOBARD - J.-P. LAMAGNERE - F. LAMISSE – J. LANSAC
J. LAUGIER - G. LELORD - G. LEROY - Y. LHUINTRE - M. MAILLET - Mlle C. MERCIER - E/H. METMAN
J. MOLINE - Cl. MORAINÉ - H. MOURAY - J.P. MUH - J. MURAT - Mme T. PLANIOL - Ph. RAYNAUD
Ch. ROSSAZZA - Ph. ROULEAU - A. SAINDELLE - J.J. SANTINI - D. SAUVAGE - M.J. THARANNE
J. THOUVENOT - B. TOUMIEUX - J. WEILL.

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

MM.	ALISON Daniel	Radiologie et Imagerie médicale
	ANDRES Christian	Biochimie et Biologie moléculaire
	ARBEILLE Philippe	Biophysique et Médecine nucléaire
	AUPART Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
Mme	AUTRET-LECA Elisabeth	Pharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique
MM.	BABUTY Dominique	Cardiologie
Mmes	BARILLOT Isabelle	Cancérologie ; Radiothérapie
	BARTHELEMY Catherine	Physiologie
MM.	BAULIEU Jean-Louis	Biophysique et Médecine nucléaire
	BERNARD Louis	Maladies infectieuses ; maladies tropicales
	BEUTTER Patrice	Oto-Rhino-Laryngologie
	BINET Christian	Hématologie ; Transfusion
	BODY Gilles	Gynécologie et Obstétrique
	BONNARD Christian	Chirurgie infantile
	BONNET Pierre	Physiologie
Mme	BONNET-BRILHAULT Frédérique	Physiologie
MM.	BOUGNOUX Philippe	Cancérologie ; Radiothérapie
	BRUNEREAU Laurent	Radiologie et Imagerie médicale
	BUCHLER Matthias	Néphrologie
	CALAIS Gilles	Cancérologie ; Radiothérapie
	CAMUS Vincent	Psychiatrie d'adultes
	CHANDENIER Jacques	Parasitologie et Mycologie
	CHANTEPIE Alain	Pédiatrie
	CHARBONNIER Bernard	Cardiologie
	COLOMBAT Philippe	Hématologie ; Transfusion
	CONSTANS Thierry	Médecine interne ; Gériatrie et Biologie du vieillissement
	CORCIA Philippe	Neurologie
	COSNAY Pierre	Cardiologie
	COTTIER Jean-Philippe	Radiologie et Imagerie médicale
	COUET Charles	Nutrition
	DANQUECHIN DORVAL Etienne	Gastroentérologie ; Hépatologie
	DE LA LANDE DE CALAN Loïc	Chirurgie digestive
	DE TOFFOL Bertrand	Neurologie
	DEQUIN Pierre-François	Thérapeutique ; médecine d'urgence
	DESTRIEUX Christophe	Anatomie
	DIOT Patrice	Pneumologie
	DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague	Anatomie & Cytologie pathologiques
	DUMONT Pascal	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	FAUCHIER Laurent	Cardiologie
	FAVARD Luc	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	FETISSOF Franck	Anatomie et Cytologie pathologiques
	FOUQUET Bernard	Médecine physique et de Réadaptation
	FRANCOIS Patrick	Neurochirurgie
	FUSCIARDI Jacques	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	GAILLARD Philippe	Psychiatrie d'Adultes
	GOGA Dominique	Chirurgie maxillo-faciale et Stomatologie
	GOUDEAU Alain	Bactériologie -Virologie ; Hygiène hospitalière
	GOUPILLE Philippe	Rhumatologie
	GRUEL Yves	Hématologie ; Transfusion
	GUILMOT Jean-Louis	Chirurgie vasculaire ; Médecine vasculaire
	GUYETANT Serge	Anatomie et Cytologie pathologiques
	HAILLOT Olivier	Urologie
	HALIMI Jean-Michel	Thérapeutique ; médecine d'urgence (Néphrologie et Immunologie clinique)
	HERAULT Olivier	Hématologie ; transfusion
	HERBRETEAU Denis	Radiologie et Imagerie médicale
Mme	HOMMET Caroline	Médecine interne, Gériatrie et Biologie du vieillissement
MM.	HUTEN Noël	Chirurgie générale
	LABARTHE François	Pédiatrie
	LAFFON Marc	Anesthésiologie et Réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence
	LANSON Yves	Urologie
	LARDY Hubert	Chirurgie infantile
	LASFARGUES Gérard	Médecine et Santé au Travail
	LEBRANCHU Yvon	Immunologie

	LECOMTE Pierre	Endocrinologie et Maladies métaboliques
	LECOMTE Thierry	Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie
	LEMARIE Etienne	Pneumologie
	LESCANNE Emmanuel	Oto-Rhino-Laryngologie
	LINASSIER Claude	Cancérologie ; Radiothérapie
	LORETTE Gérard	Dermato-Vénérologie
	MACHET Laurent	Dermato-Vénérologie
	MAILLOT François	Médecine Interne
	MARCHAND Michel	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
	MARRET Henri	Gynécologie et Obstétrique
	MULLEMAN Denis	Rhumatologie
	NIVET Hubert	Néphrologie
	PAGES Jean-Christophe	Biochimie et biologie moléculaire
	PAINTAUD Gilles	Pharmacologie fondamentale, Pharmacologie clinique
	PATAT Frédéric	Biophysique et Médecine nucléaire
	PERROTIN Dominique	Réanimation médicale ; médecine d'urgence
	PERROTIN Franck	Gynécologie et Obstétrique
	PISELLA Pierre-Jean	Ophtalmologie
	QUENTIN Roland	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
	RICHARD-LENOBLE Dominique	Parasitologie et Mycologie
	ROBIER Alain	Oto-Rhino-Laryngologie
	ROINGEARD Philippe	Biologie cellulaire
	ROSSET Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	ROYERE Dominique	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
	RUSCH Emmanuel	Epidémiologie, Economie de la Santé et Prévention
	SALAME Ephrem	Chirurgie digestive
	SALIBA Elie	Biologie et Médecine du développement et de la Reproduction
Mme	SANTIAGO-RIBEIRO Maria	Biophysique et Médecine Nucléaire
	SIRINELLI Dominique	Radiologie et Imagerie médicale
	THOMAS-CASTELNAU Pierre	Pédiatrie
	TOUTAIN Annick	Génétique
	VAILLANT Loïc	Dermato-Vénérologie
	VELUT Stéphane	Anatomie
	WATIER Hervé	Immunologie.

PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

Mme	LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie	Médecine Générale
-----	---------------------------	-------------------

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.	HUAS Dominique	Médecine Générale
	LEBEAU Jean-Pierre	Médecine Générale
	MALLET Donatien	Soins palliatifs
	POTIER Alain	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme	ARBEILLE Brigitte	Biologie cellulaire
M.	BARON Christophe	Immunologie
Mme	BAULIEU Françoise	Biophysique et Médecine nucléaire
M.	BERTRAND Philippe	Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication
Mme	BLANCHARD-LAUMONIER Emmanuelle	Biologie cellulaire
M	BOISSINOT Eric	Physiologie
MM.	BRILHAULT Jean	Chirurgie orthopédique et traumatologique
	CORTESE Samuele	Pédopsychiatrie
Mmes	DUFOUR Diane	Biophysique et Médecine nucléaire
	EDER Véronique	Biophysique et Médecine nucléaire
	FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie	Anatomie et Cytologie pathologiques
	GAUDY-GRAFFIN Catherine	Bactériologie - Virologie ; Hygiène hospitalière
M.	GIRAUDEAU Bruno	Biostatistiques, Informatique médicale et Technologies de Communication
Mme	GOUILLEUX Valérie	Immunologie
MM.	GUERIF Fabrice	Biologie et Médecine du développement et de la reproduction

	GYAN Emmanuel	Hématologie, transfusion
M.	HOARAU Cyrille	Immunologie
M.	HOURIOUX Christophe	Biologie cellulaire
Mme	LARTIGUE Marie-Frédérique	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
Mmes	LE GUELLEC Chantal	Pharmacologie fondamentale ; Pharmacologie clinique
	MACHET Marie-Christine	Anatomie et Cytologie pathologiques
MM.	MARCHAND-ADAM Sylvain	Pneumologie
	MEREGHETTI Laurent	Bactériologie-Virologie ; Hygiène hospitalière
M.M	PIVER Eric	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	SAINT-MARTIN Pauline	Médecine légale et Droit de la santé
M.	VOURC'H Patrick	Biochimie et Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFERENCES

Mlle	BOIRON Michèle	Sciences du Médicament
	ESNARD Annick	Biologie cellulaire
M.	LEMOINE Maël	Philosophie
Mlle	MONJAUZE Cécile	Sciences du langage - Orthophonie
M.	PATIENT Romuald	Biologie cellulaire

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M.	ROBERT Jean	Médecine Générale
----	-------------	-------------------

CHERCHEURS C.N.R.S. - INSERM

MM.	BIGOT Yves	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
	BOUAKAZ Ayache	Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
Mmes	BRUNEAU Nicole	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	CHALON Sylvie	Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
MM.	COURTY Yves	Chargé de Recherche CNRS – U 618
	GAUDRAY Patrick	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
	GOUILLEUX Fabrice	Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 6239
Mmes	GOMOT Marie	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	HEUZE-VOURCH Nathalie	Chargée de Recherche INSERM – U 618
MM.	LAUMONNIER Frédéric	Chargé de Recherche INSERM - UMR CNRS-INSERM 930
	LE PAPE Alain	Directeur de Recherche CNRS – U 618
Mmes	MARTINEAU Joëlle	Chargée de Recherche INSERM – UMR CNRS-INSERM 930
	POULIN Ghislaine	Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS-INSERM 930

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

Pour l'Ecole d'Orthophonie

Mme	DELORE Claire	Orthophoniste
M	GOUIN Jean-Marie	Praticien Hospitalier
M.	MONDON Karl	Praticien Hospitalier
Mme	PERRIER Danièle	Orthophoniste

Pour l'Ecole d'Orthoptie

Mme	LALA Emmanuelle	Praticien Hospitalier
M.	MAJZOUB Samuel	Praticien Hospitalier

Pour l'Ethique Médicale

Mme	BIRMELE Béatrice	Praticien Hospitalier
-----	------------------	-----------------------

Remerciements

A Monsieur le professeur Elie SALIBA de m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Je lui exprime ma reconnaissance pour l'enseignement délivré dans le cadre de ma formation en néonatalogie et pour avoir suivi mon travail tout au long de ces années.

A Monsieur le professeur Christian ANDRES pour m'avoir accueilli et encadré depuis le MASTER 2 et soutenu jusqu'à la préparation de ma thèse.

A Monsieur le professeur Pierre THOMAS-CASTELNAU d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse et de m'avoir ouvert, dès le début de l'internat, le champ de recherche lors de mon MASTER 1.

A Madame le Docteur Géraldine FAVRAIS pour avoir encadré la préparation de ma thèse et pour m'avoir soutenu dans mon parcours. Je la remercie de son aide très importante et de sa disponibilité toujours bienveillante.

A toutes les personnes de l'Unité Inserm 930 pour leur accueil, leurs encouragements et les nombreux conseils apportés au cours de la préparation de cette thèse. A Charlotte, Audrey.

A Monsieur le Docteur Patrick Vour'h pour avoir pris de son temps pour me former à la recherche.

Aux services de réanimation pédiatrique et néonatale de Tours d'où est née cette envie de pratiquer la néonatalogie.

A tous mes co-internes et amis et particulièrement à Marie pour sa fidélité en amitié et son soutien tout au long de nos études.

A tous mes amis, à Lucie avec toute mon affection et ma reconnaissance

A mes parents qui m'ont toujours soutenu devant l'adversité et m'ont appris à ne jamais baisser les bras.

A mes sœurs pour tous nos bons moments de complicité.

A Geoffroy avec tout mon amour...

A Adam

Abréviations

ADNc : Acide désoxyribonucléique
complémentaire

AMPc : Adénosine monophosphate
cyclique

ARN : Acide ribonucléique

bFGF : Basic fibroblast growth factor

CNPase : 2',3'-cyclic nucléotide 3'-
phosphodiesterase

COX-2 : Cyclooxygénase 2

DAPI : 4',6'-diamidino-2-phényllindole

DMEM : Milieu de Eagle modifié par
Dulbecco

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNase I : Désoxyribonucléase I

dNTP : Désoxyribonucléotides

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Acide éthylène diamine
tétracétique

EP1,2,3,4 : Récepteurs à la PGE2 1, 2, 3, 4

ETF : Echographie transfontanellaire

GalC : Galactocérébroside

GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate
déshydrogénase

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

HBSS : Solution saline tamponnée de
Hank

IL-1 β : Interleukine- 1 β

IL-6 : Interleukine- 6

IRM : Imagerie par résonnance
magnétique

LPS: lipopolysaccharide

LPV : Leucomalacie périventriculaire

MBP : Myelin basic protein

OPC : Précurseurs des oligodendrocytes

PBS : Tampon phosphate salin

PCR : Polymerase chain reaction ou
réaction en chaîne par polymérase

PDGFR α : Platelet-derived Growth Factor
Receptor alpha

PDGF-AA: Platelet-derived- growth-
factor-AA

PGE2 : Prostaglandine E2

RCPG : récepteur couplé à la protéine G

RT-PCR : Reverse transcriptase-PCR

SA : Semaines d'aménorrhée

SVF : Sérum de veau foetal

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

Sommaire

Introduction.....	10
A. La Leucomalacie périventriculaire du prématuré.....	10
1. Contexte.....	10
2. Anatomopathologie.....	12
3. Inflammation et LPV.....	15
B. Oligodendrocyte et LPV.....	16
1. La lignée oligodendrocytaire.....	16
2. Vulnérabilité des oligodendrocytes.....	18
C. Résultats préliminaires.....	21
1. Les modèles animaux de LPV.....	21
2. Il-1 β et COX-2.....	22
3. Prostaglandine E2.....	24
D. Objectif de l'étude.....	26
Matériel et méthodes.....	27
A. Culture cellulaire.....	27
1. Culture primaire mixte de cellules gliales :.....	27
2. Culture secondaire enrichie en oligodendrocytes :.....	28
3. Effet de la PGE2 sur les cultures cellulaires :.....	30
B. Immunocytochimie.....	33
4. Caractérisation de la pureté des cultures.....	34
5. Marquage de la différenciation oligodendrocytaire.....	34
6. Comptage de la mortalité cellulaire.....	35
C. RT-PCR.....	36
1. Extraction d'ARN.....	36
2. RT-PCR.....	37
D. Analyse statistique.....	40
Résultats.....	41
A. Pureté des cultures secondaires d'OPC.....	41
B. Effet de la PGE2 sur la maturation oligodendrocytaire.....	43
1. Evolution des OPC.....	43
2. Evolution des pré-oligodendrocytes O4+.....	46
3. Evolution des oligodendrocytes immatures.....	47
4. Evolution des oligodendrocytes matures.....	49
C. Effet de la PGE2 sur la mortalité cellulaire.....	52
D. Profils d'expression des récepteurs EP et influence de la PGE2.....	54
Discussion.....	56
A. Discussion de la méthode.....	57
B. Discussion des résultats.....	58
1. PGE2 et maturation oligodendrocytaire.....	58
2. PGE2 et expression de ces récepteurs.....	59
C. Conclusion.....	60
Bibliographie.....	61
Résumé.....	66

Introduction

A. La Leucomalacie périventriculaire du prématuré

1. Contexte

Depuis 1993, selon les recommandations de l'OMS, toute naissance à un âge gestationnel supérieur à 22 semaines ou un poids de naissance supérieur à 500 grammes doit être comptabilisée comme naissance et déclarée à l'état civil. La prématurité se définit par une naissance avant 37 semaines d'aménorrhée (SA) révolues et la grande prématurité par une naissance survenue avant 32 SA. Le taux de naissances prématurées, parmi les naissances vivantes a augmenté en France de 5.9% en 1998 (5,9%) à 7.2% en 2003 (1). La grande prématurité correspondent à 1.3% des naissances vivantes (2).

L'étiologie de la grande prématurité est multifactorielle. Le déclenchement de la naissance peut être de cause maternelle ou fœtale, spontanée ou consentie c'est-à-dire secondaire à une décision médicale. La prématurité spontanée, regroupant le travail prématuré spontané et la rupture prématurée des membranes, est la cause la plus fréquente. Ces dernières catégories sont souvent associées à une infection et un mécanisme inflammatoire.

Les raisons de l'augmentation du nombre des naissances prématurées sont multiples, avec notamment l'augmentation du taux de grossesses multiples. D'importantes évolutions ont été observées ces dernières années en ce qui concerne la prise en charge néonatale des

prématurés : modification de la prise en charge obstétricale avec la corticothérapie anténatale création des soins intensifs néonataux, administration de surfactant, assistance respiratoire... L'ensemble de ces mesures a augmenté le taux de survie des enfants grands prématurés et permis une prise en charge de nouveau-nés de plus en plus prématurés (3). Ainsi, la cohorte française formant la base de données EPIPAGE montrait des taux de survie à la sortie de l'hôpital en 1997 de 31% pour une naissance à 24 SA, 78% à 28 SA et 97% à 32 SA.

Cependant, le pronostic fonctionnel à long terme de ces nouveau-nés reste grévé par l'existence de séquelles neurologiques qu'elles soient motrices, sensorielles ou cognitives. Cette encéphalopathie, ainsi que les anomalies morphologiques cérébrales qui lui sont associées, est corrélée à l'âge de gestation et spécifique de la naissance prématurée essentiellement avant 33 SA (4). En effet, selon de récentes études, environ 40% des anciens grands prématurés (< 33 SA) nécessitent une prise en charge spécialisée à 5 ans. Ces symptômes s'étendent de troubles d'apprentissages dans 1 cas sur 2, jusqu'à des handicaps sévères compromettant l'autonomie dans 10% des cas (5).

Sur le plan clinique, la paralysie cérébrale ou « *cerebral palsy* » regroupe des symptômes divers. Les séquelles peuvent être soit motrices, sensorielles (6), et/ou cognitives (7). Cependant, on observe ces deux dernières décennies une diminution des handicaps sévères à la faveur d'handicaps plus légers (8) (Figure 1).

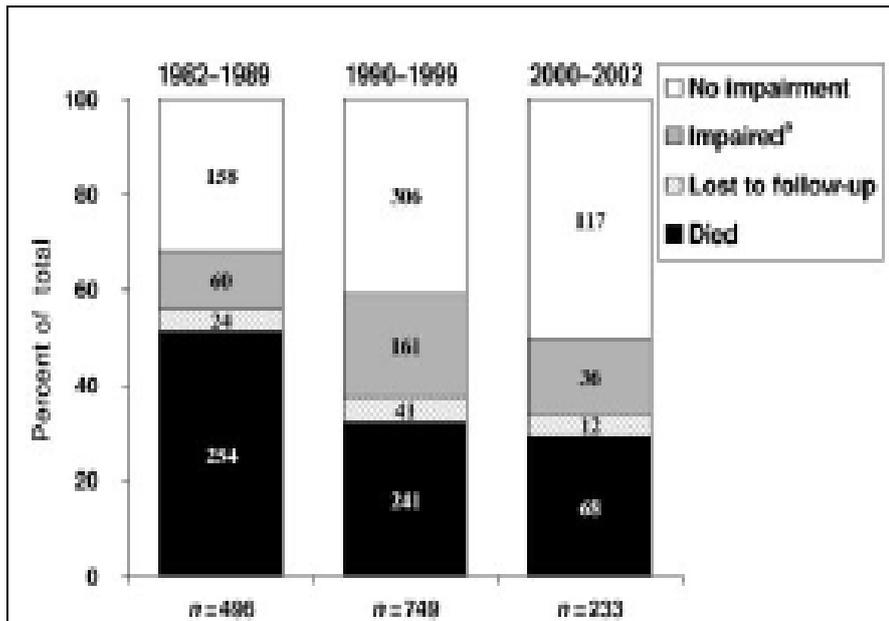


Figure 1 : Evolution du devenir des nouveau-nés prématurés d'un âge gestationnel moyen de 27 SA à l'âge de 20 mois au cours de trois périodes de temps : i) 1982-1989, ii) 1990-1999, iii) 2000-2002. Case blanche : survivants sans handicap majeur, case grise : survivants avec handicaps sévère, case hachurée : perdus de vue, case noire : décès à la période néonatale (8).

2. Anatomopathologie

Pendant la période néonatale, le nouveau-né est particulièrement susceptible de développer des lésions cérébrales : hémorragies intraventriculaires, hydrocéphalie, atteintes cérébelleuses et de la substance blanche. Les lésions de la substance blanche semblent être prédominantes et concernent préférentiellement la substance blanche périventriculaire, particulièrement vulnérable aux agressions chez l'Humain entre 24 et 32 SA. La première description neuropathologique d'atteinte de la substance blanche a été publiée en 1962 par Banker et Larroche (9). Ces atteintes de la substance blanche périventriculaire, regroupées sous le terme de Leucomalacie périventriculaire (LPV) peuvent être de 2 types : soit une forme focale, localisée en périventriculaire sous forme de kystes de nécrose, devenue rare

(moins de 5% des enfants nés avant 33 SA) depuis l'avancée de la prise en charge réanimatoire ; soit une forme diffuse comprenant des nécroses focales microscopiques diffuses évoluant vers des « cicatrices » gliales, davantage rencontrée actuellement (près de 80% des moins de 28 SA) (10). L'augmentation de la prévalence de la forme diffuse de LPV est secondaire à l'amélioration du taux de survie des prématurés et à l'amélioration des techniques de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (11). Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la forme diffuse de la LPV sont beaucoup étudiés actuellement mais reste encore flous.

La LPV peut être explorée par deux examens paracliniques d'imagerie : l'échographie transfontanellaire (ETF) qui retrouve des zones hyperéchogènes hétérogènes témoignant de la forme focale de la LPV. L'IRM, plus récemment, permettant de diagnostiquer la forme diffuse de la LPV. Au sein de la forme diffuse s'associe une ventriculomégalie, des troubles de la giration corticale, et un amincissement de la substance blanche (11)(12).

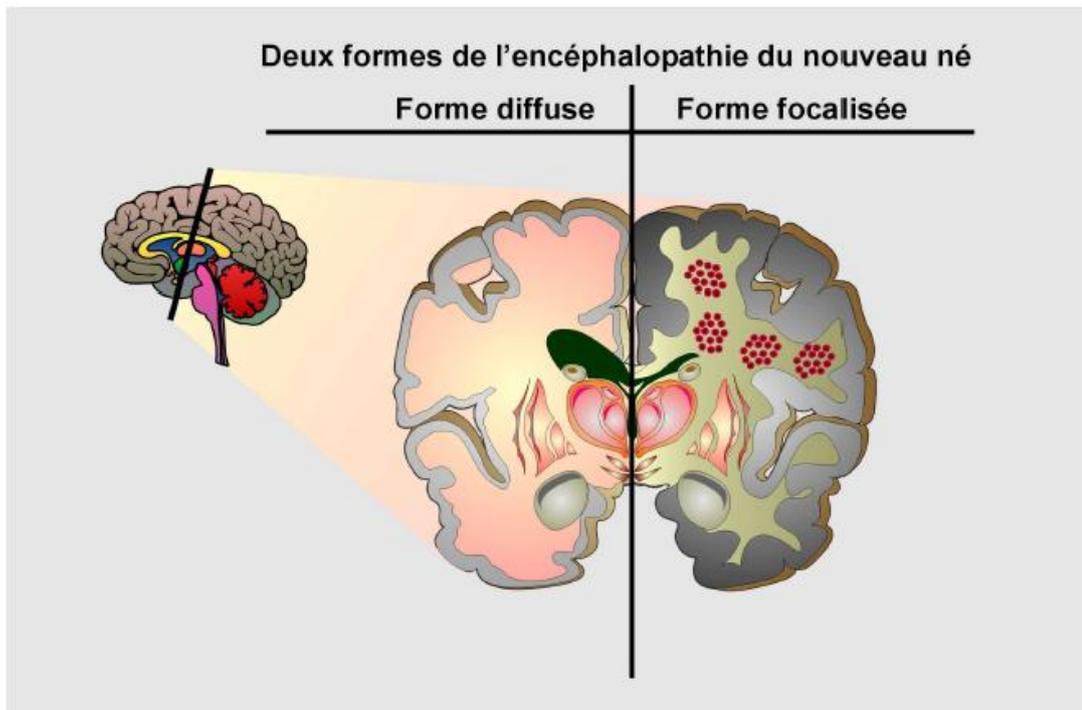


Figure 3 : Formes radiologiques des 2 types d'atteintes de la SB en développement : i) la forme diffuse (à gauche sur le schéma) s'accompagne d'une ventriculomégalie, d'un amincissement du ruban cortical et une diminution de la giration ; ii) La LPV focale (à droite) s'associe à des kystes de nécrose au sein de la SB essentiellement périventriculaire. Schéma adapté de (Pierson et al, 2007) (13).

3. Inflammation et LPV

De nombreuses études ont démontré qu'il existait plusieurs facteurs de risque à la LPV ainsi qu'aux pathologies de la substance blanche en général (14). Les deux mécanismes majoritairement en cause sont l'hypoxie-ischémie et l'inflammation. Les nouveau-nés prématurés sont particulièrement sensibles à l'ischémie du fait de facteur intrinsèque physiologique vasculaire tel que les « *arterial border end zones* » (branches terminales artérielles encore peu développées chez le prématuré) et les troubles de l'autorégulation du débit sanguin cérébral (10). En effet, les grands prématurés peuvent être incapables à compenser leur débit sanguin cérébral pour des modifications mineures de leur circulation systémique (15). L'association de ces deux facteurs physiologiques à un accident hypoxique ou ischémique peut entraîner l'apparition de lésions focales nécrotiques de LPV (16).

L'infection-inflammation représente le deuxième mécanisme majeur en cause dans la LPV (17). De nombreuses études épidémiologiques ont montré une association entre l'existence d'une infection maternelle notamment la chorioamniotite (infection des annexes utérines) et l'apparition d'une LPV chez le nouveau-né (18)(19)(17)(20). Nous développerons les mécanismes physiopathologiques par la suite.

B. Oligodendrocyte et LPV

1. La lignée oligodendrocytaire

L'oligodendrocyte est une cellule gliale du système nerveux central. L'oligodendrocyte mature forme avec ses ramifications la gaine de myéline qui facilite la conduction de l'influx nerveux le long de l'axone du neurone. La lignée oligodendrocytaire se développe à partir de progéniteurs issus de glioblastes de la zone ventriculaire dans le système nerveux central (21).

La maturation des oligodendrocytes passe par 4 différents stades (figure 4).

- La cellule précurseur de l'oligodendrocyte (OPC)

L'OPC est une petite cellule d'aspect bipolaire avec peu de cytoplasme. Elle présente un haut pouvoir prolifératif. Elle se caractérise par un marquage positif par deux marqueurs : le « platelet-derived-growth-factor-alpha-receptor » (PDGFR α) (22) et l'anticorps A2B5 (23). Le PDGFR α est un récepteur pour le « platelet-derived-growth-factor AA » (PDGF-AA), facteur de croissance permettant la prolifération oligodendrocytaire (24). Il s'agit de progéniteurs de type O2-A qui peuvent se différencier en oligodendrocytes mais également, en plus faible quantité, en astrocytes (25).

- Le pré-oligodendrocyte

Le pré-oligodendrocyte est le deuxième stade de maturation oligodendrocytaire. Il s'agit d'une petite cellule présentant plusieurs ramifications. Elle se caractérise par un marquage par l'anticorps de surface O4, forme sulfatée de la galactocérébroside (GalC) (26). Elle perd alors sa capacité de prolifération.

Durant la période de gestation correspondant à nos grands prématurés, c'est-à-dire entre 24 et 32 SA, le stade oligodendrocytaire le plus abondant est le pré-oligodendrocyte (27) (figure 5).

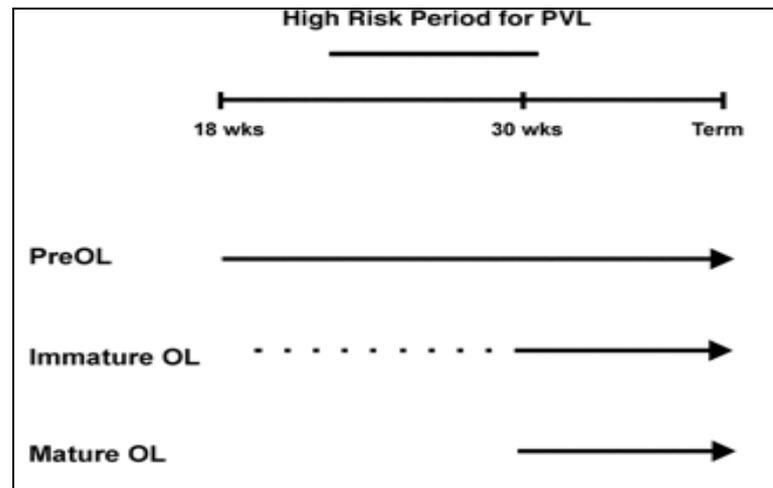


Figure 5 : Diagramme de progression de la lignée oligodendrocytaire dans la substance blanche chez l'humain pendant la dernière moitié de la gestation. La période à fort risque de LPV coïncide avec le stade de développement de pré-oligodendrocyte. Wks = semaines de gestation (27).

2. Vulnérabilité des oligodendrocytes

Les lésions cérébrales surviennent dans des conditions particulières. Il existe plusieurs mécanismes pouvant aboutir isolément ou conjointement à ces lésions : l'excitotoxicité, le stress oxydatif, l'activation microgliale et la défaillance mitochondriale et sa cascade aboutissant à l'apoptose cellulaire (figure 6). Des travaux publiés ont démontré une sensibilité importante des pré-oligodendrocytes au stress oxydatif et à l'excitotoxicité (10).

L'excitotoxicité se fait par l'intermédiaire d'une accumulation du glutamate dans la fente synaptique lors d'un stress essentiellement de type hypoxie-ischémie aboutissant à la mort cellulaire. Ainsi, plusieurs études récentes ont démontré l'existence de récepteurs NMDA (28)(29)(30), AMPA et Kainate (31) au glutamate sur l'oligodendrocyte. Le blocage de ces récepteurs glutamatergiques par des antagonistes semble protéger des atteintes de la substance blanche (31) et en partie des lésions de LPV dans des modèles animaux (32).

Le stress oxydatif se résume à la production de radicaux libres délétères pour la cellule. Selon une étude, le pré-oligodendrocyte semble plus sensible au stress oxydatif que l'oligodendrocyte mature. En effet, dans un milieu pauvre en anti-oxydant (déplété en glutathion), la synthèse de radicaux libres par les pré-oligodendrocytes est nettement augmentée et leur taux de survie nettement diminué par rapport aux oligodendrocytes matures, témoignant d'un phénomène de susceptibilité maturation-dépendant (33).

L'activation de la microglie est secondaire au stress excitotoxique mais se produit également par le biais de l'inflammation. Cette activation va aboutir à deux phénomènes : production de stress oxydatif (34), excitotoxicité (35), et relargage de cytokines pro-inflammatoires. Les deux premiers mécanismes étant délétères aux oligodendrocytes, nous verrons par la suite que les cytokines pro-inflammatoires sont également directement impliquées dans la pathogénèse des lésions de LPV.

Cette sensibilité accrue aux mécanismes d'agression cellulaire fait du pré-oligodendrocyte, la cellule-cible de la LPV (36).

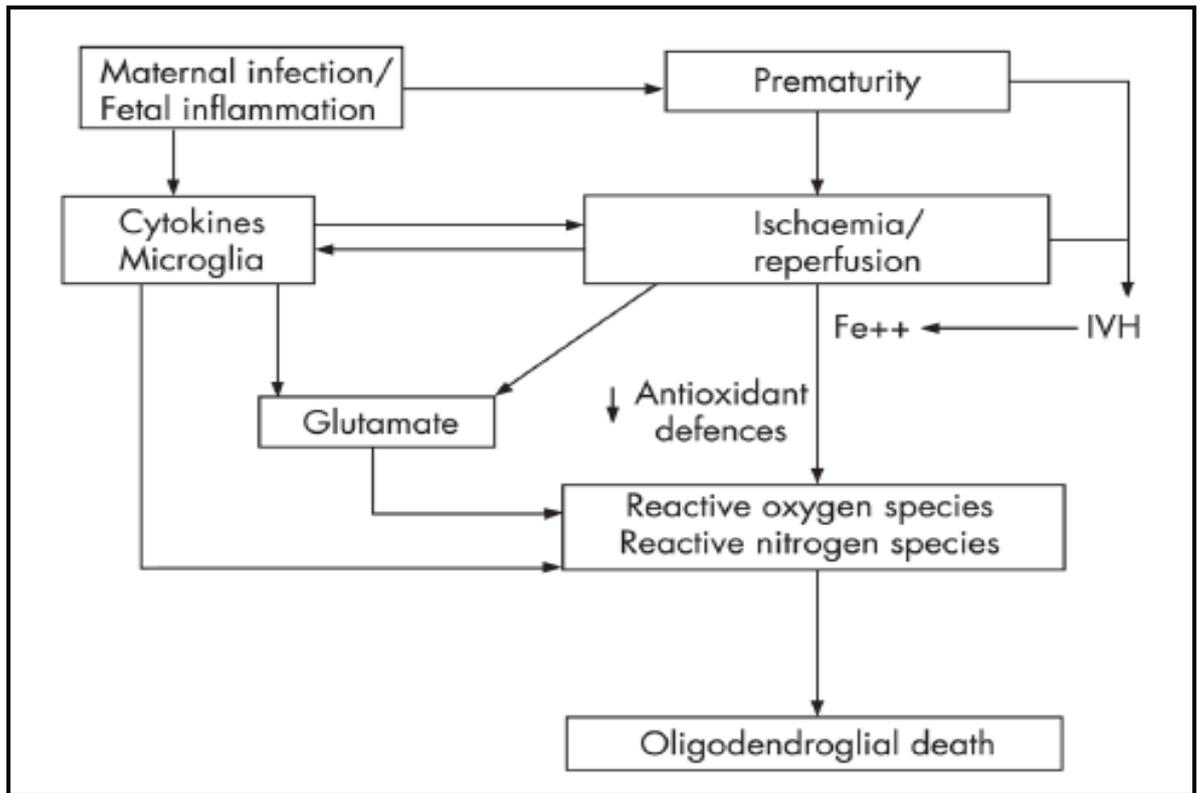


Figure 6. Mécanismes pathogéniques impliqués dans les lésions de LPV(10).

C. Résultats préliminaires

1. Les modèles animaux de LPV

De nombreux modèles animaux ont été mis en place afin d'étudier la physiopathologie de la LPV. Les modèles de souris et de rats sont particulièrement intéressants du fait de l'immaturation physiologique du cerveau des nouveau-nés correspondant au stade de développement cérébral du prématuré entre 22 et 24 SA à leur naissance. Trois modèles de LPV sont particulièrement étudiés (37) :

- ◇ Le modèle hypoperfusion : la reproduction d'un accident ischémique par une hypoperfusion ou une hypooxygénation.
- ◇ Le modèle excitotoxique : l'injection d'iboténate intracérébrale, un agoniste glutamatergique, au cinquième jour de vie chez le souriceau nouveau-né produit des lésions kystiques évocatrices de LPV (38).
- ◇ Le modèle inflammation : Injection de LPS, endotoxine bactérienne, à haute dose reproduit des lésions cérébrales nécrotiques de la SB (39).

Le facteur infection-inflammation est rencontré dans 35% des cas de naissances prématurées (19). En effet, l'infection-inflammation est présente dans 32% des cas de menaces d'accouchement prématuré sans rupture prématurée des membranes (40), et dans 42% des cas avec rupture prématurée des membranes (41). A l'inflammation, est associée la libération au niveau systémique de cytokines pro-inflammatoires. Dans plusieurs études, une relation étroite a été rapportée entre l'existence de LPV chez des enfants prématurés et des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires notamment l'Interleukine-1 β (IL-1 β),

l'Interleukine-6 (IL-6), et le Tumor Necrosis Factor α (TNF α) (42)(38). La sensibilisation par le lipopolysaccharide (LPS), endotoxine composante de la paroi bactérienne, préalablement à l'hypoxie-ischémie en période néonatale entraîne une augmentation de la taille des lésions produites par l'hypoxie-ischémie (43)(44). Cette action est mimée par les cytokines TNF α et IL-1 β (44). Parallèlement, dans le modèle iboténate, la réalisation d'injections intrapéritonéales préalables d'interleukine-1- β du premier au cinquième jour de vie majore la taille de la lésion de la substance blanche produite par l'iboténate (38).

De plus, des travaux récents ont montré que le traitement isolé par IL1- β , en intrapéritonéal chez des souriceaux nouveau-nés, entraîne au 30^{ème} jour de vie un défaut de myélinisation. Ce trouble de myélinisation s'associe à une diminution du nombre d'oligodendrocytes matures et une augmentation de précurseurs d'oligodendrocytes. La prolifération et la mortalité oligodendrocytaire ont été étudiées dans ce modèle et il n'existe pas d'effet de l'IL1- β sur ces deux facteurs. Ces résultats sous-entendent qu'il existerait un blocage ou retard de maturation des oligodendrocytes sous l'effet de l'inflammation via l'IL1- β (45).

2. IL-1 β et COX-2

La toxicité des cytokines systémiques dont l'IL-1 β sur le cerveau en développement peut s'expliquer par l'activation de la Cyclooxygénase-2 (COX-2) au niveau de la barrière hémato-encéphalique (figure 7). Il existe deux isotypes de la cyclooxygénase (COX), la COX-1 qui est constitutionnelle et la COX-2 qui va être activée dans les situations d'inflammation par les cytokines pro-inflammatoires (46). Un des métabolites principaux de la COX-2 est la prostaglandine E2 (PGE2). Dans un modèle de pathologie de la substance blanche mimant la sclérose en plaque, la surexpression de COX-2 est associée à une augmentation de la mortalité

des oligodendrocytes (47). D'autres travaux récents ont montré que l'association de l'ibuprofène, inhibiteur sélectif de la COX-2, à une hypoxie-ischémie entraînait une atténuation du défaut en oligodendrocytes matures produite par l'hypoxie-ischémie. De plus, il était observé la diminution des taux intracérébraux en IL-1 β et TNF- α et une diminution de l'expression de la COX-2 en ARNm (48).

Dans le modèle IL-1 β , chez le souriceau nouveau-né, l'administration d'IL1- β induit une augmentation de la concentration intracérébrale de PGE2. A l'inverse, l'inhibition pharmacologique de la COX-2 par le nimésulide se traduit par une absence d'élévation de la PGE2 intracérébrale et diminue l'effet toxique des cytokines sur la myélinisation (49). La neutralisation de la synthèse de PGE2 par le nimésulide, si on l'associe à l'IL1- β , permet également de restaurer une myélinisation normale au 30^{ème} jour de vie (données personnelles – G. Favrais). Ainsi, l'augmentation de la PGE2 cérébrale à la période néonatale semble être impliquée dans les atteintes de la substance blanche et de la lignée oligodendrocytaire observées.

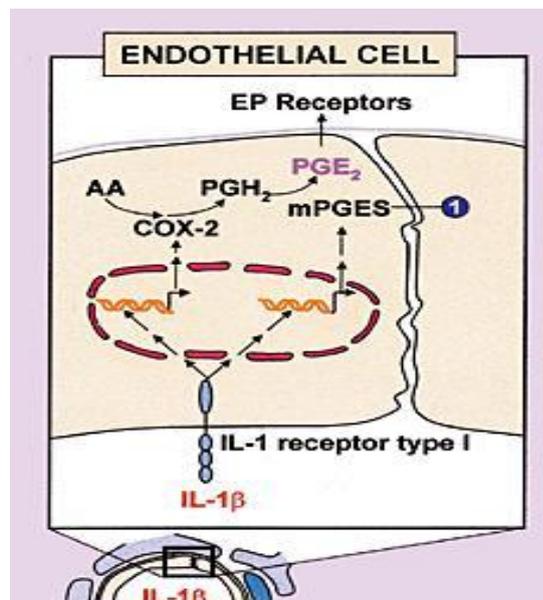


Figure 7 : Activation de la COX-2 au niveau de la barrière hémato-encéphalique et synthèse de la PGE2 (50).

3. Prostaglandine E2

Les prostaglandines sont des métabolites de l'acide arachidonique. Ce sont des agents de signalisation paracrine et autocrine qui activent de nombreux récepteurs couplés à la protéine G (RCPG). La prostaglandine E2 (PGE2) est engendrée par l'action d'une des prostaglandines E synthèses sur la prostaglandine H2 (PGH2) (51) (Figure 8).

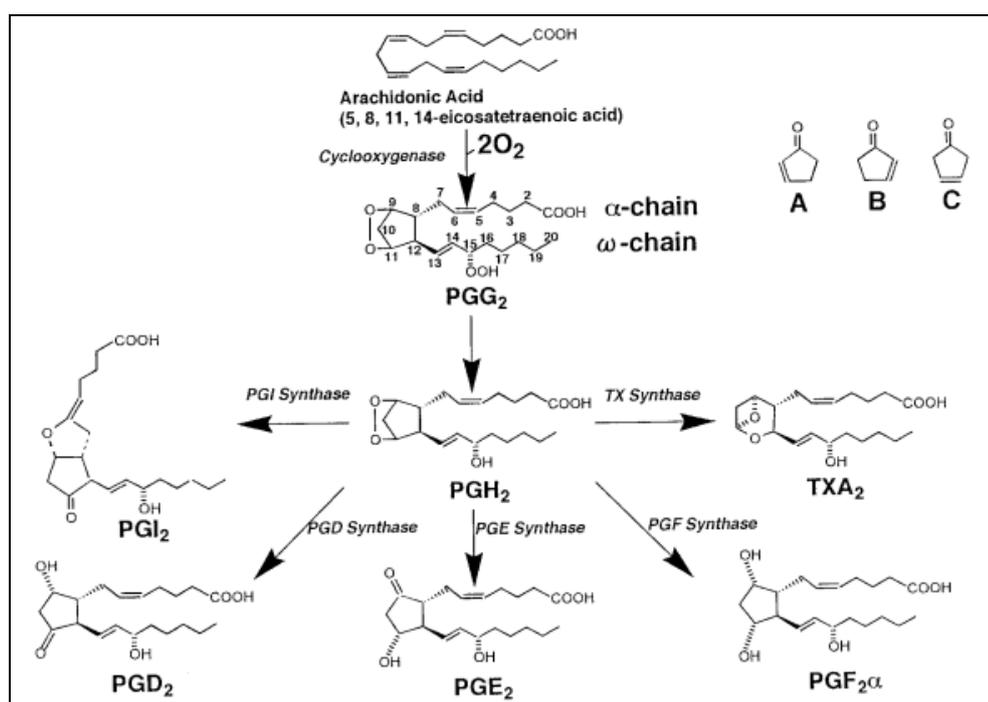


Figure 8 : Voies de biosynthèse des différents prostanoïdes, les prostaglandines PGD₂, PGE₂, PGF₂ a, PGG₂, PGH₂, PGI₂, Throboxane A2 (TxA₂), à partir de l'acide arachidonique ainsi que leurs structures cycliques aromatiques (52).

La PGE₂ possède 4 types de récepteurs RCPG dont les actions sont soit neuroprotectrices (EP-2, EP-4) (53)(54)(55) ou délétères (EP-1) (56) ou variables (EP-3) (57)(58). Leurs actions passent par des modulations du taux de calcium intracellulaire pour EP-1, l'activation de l'adényl cyclase et l'augmentation de l'adénosine monophosphate

cyclique (AMPC) intracellulaire pour EP-2 et EP-4 et l'inhibition de l'adényl cyclase pour EP-3 (52) (Figure 9).

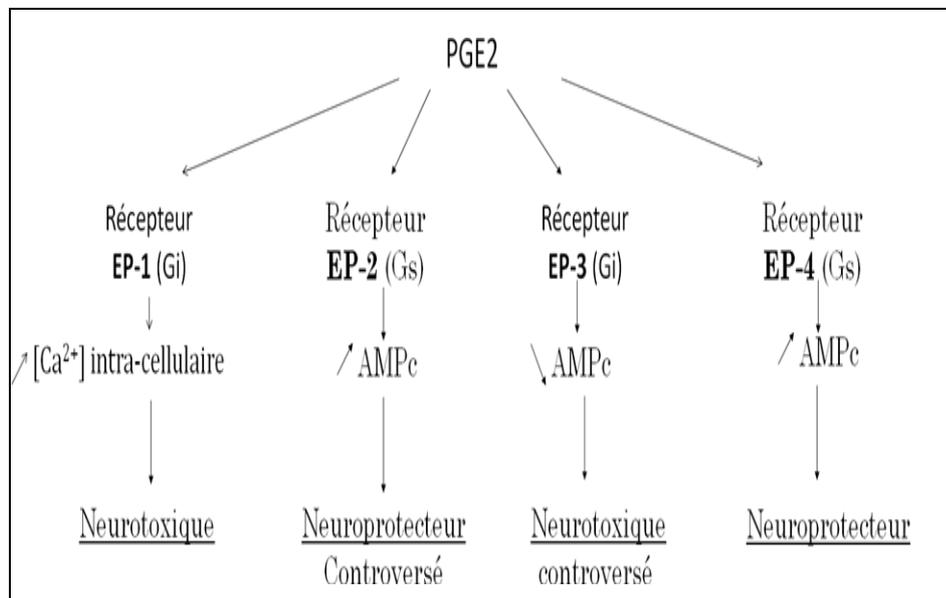


Figure 9 : Différents récepteurs de la PGE2 et leurs actions décrites dans la littérature.

L'expression des 4 récepteurs à la PGE2 par les pré-oligodendrocytes de rat en culture a été mise en évidence par la quantification de leurs acides ribonucléiques (ARN) messagers par réaction en chaîne par polymérase (PCR) (données personnelles - G.Favrais- Figure 10). Ainsi, une action directe de la PGE2 sur la lignée oligodendrocytaire pourrait participer aux anomalies observées dans la LPV.

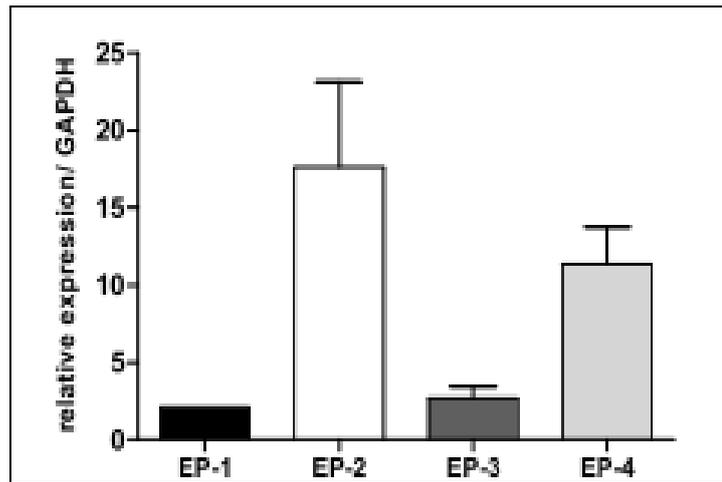


Figure 10 : Expression relative des récepteurs EP à la PGE2 chez des pré-oligodendrocytes de rats *in vitro*.

D. Objectif de l'étude

Ainsi, la SB cérébrale au cours d'une fenêtre de développement de P1 à P5 chez la souris et de 24 à 32 SA chez l'homme est particulièrement susceptible aux agressions notamment hypoxiques et inflammatoires. Les pré-oligodendrocytes semblent particulièrement vulnérables aux agressions et leurs atteintes compromettent la myélinisation physiologique.

L'objectif principal de ce projet est d'identifier l'action de la PGE2 sur la maturation oligodendrocytaire et la myélinisation en observant son effet sur des oligodendrocytes de rat en culture en fonction de leur stade de maturation et de relier cette action à la cinétique d'expression des différents récepteurs EP.

Matériel et méthodes

A. Culture cellulaire

1. Culture primaire mixte de cellules gliales :

Selon une méthode modifiée de McCarthy et De Vellis(59).

Les cultures primaires d'astrocytes et oligodendrocytes ont été réalisées à partir de cerveau de rats nouveaux nés âgés de P0 à P2, naissants d'une ratte Wistar (Janvier SAS, Saint Berthevin, France). Les rats ont été anesthésiés sur un lit de glace avant d'être disséqués. Après décapitation, le scalp a été ouvert aux ciseaux et le cerveau isolé, les bulbes olfactifs ont été retirés sous microscope ainsi que le tronc cérébral et le cervelet, l'hippocampe et enfin les méninges. Ensuite, les cortex ont été découpés avec un scalpel puis dissociés enzymatiquement au moyen d'un mélange de solution saline tamponnée de Hank (HBSS) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), désoxyribonucléase I (DNase I) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et de trypsine 0,25% (Invitrogen). Le surnageant a été collecté dans un tube de 50mL avec 5mL de milieu de culture contenant du sérum de veau fœtal inactivé SVF (PAA, Les Mureaux, France), permettant de stopper l'action de la trypsine. Après centrifugation, les tissus fragilisés ont été triturés avec une pipette pasteur puis filtrés avec un tamis cellulaire de 70 μ m. Les cellules ont été ensuiteensemencées dans des flasques de 75 cm² (environ 1 flasque par cerveau, 10 mL de milieu par flasque) dans leur milieu de

culture : milieu d'Eagle modifié par Dubelco (DMEM) avec L-glutamine (4 mM) (Invitrogen), pyruvate de sodium (1mM) (Sigma), SVF (20%) (PAA), pénicilline (50 UI/mL) et streptomycine (50 µg/mL) (Invitrogen). Les flasques ont été auparavant prétraitées au minimum 14h à la poly-L-lysine à 10 µg/mL (Sigma). Les flasques ont été placées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO₂ et saturé en humidité. Les milieux de culture ont été remplacés après 4 jours de culture puis tous les trois jours.

2. Culture secondaire enrichie en oligodendrocytes :

Après 11 jours de culture, un tapis d'astrocytes s'est formé sur toute la surface des flasques avec une deuxième couche superficielle composée d'OPC et de microglie (Figure 11a). Afin de séparer les groupes cellulaires, les flasques ont été sorties de l'incubateur, fermées hermétiquement par du parafilm et placées dans un agitateur-incubateur orbital (Orbital Incubator SI50, Fisher scientific, Illkrich, France) afin d'isoler les OPC (60). Elles ont été agitées pendant 1h à 200rpm et à 37°C. Le surnageant a été retiré et jeté pour éliminer la microglie qui est la population dont l'adhésion au tapis astrocytaire est la plus faible. Les flasques ont été réagitées pendant 18 à 20h pour permettre aux OPC plus adhérents que la microglie de se décrocher du tapis d'astrocytes. Le surnageant enrichi en OPC a été collecté au terme de la procédure. Une nouvelle phase de séparation sélective a été réalisée sur le surnageant pour se débarrasser de la microglie et des astrocytes résiduels en jouant sur leur capacité d'adhérence rapide aux matières plastiques et rendre ainsi la culture d'OPC la plus pure possible. Pour cela, le surnageant, riche en OPC, a été transféré dans des boîtes de pétri non traitées pour incubation à 37°C pendant 1h afin que la microglie restante adhère à la surface (Figure 11b). Le surnageant a été récupéré et la boîte est jetée. Cette opération est réalisée deux fois afin d'éliminer le maximum de microglie. Ensuite la solution cellulaire a

été centrifugée puis les cellules ont été comptées avec la méthode du bleu Trypan. Les cellules ont alors étéensemencées dans des puits prétraités à la poly-L-lysine à une concentration de $7,7$ à 10.10^4 cellules/mL. Le milieu de culture était le suivant : DMEM avec 4mM de L-glutamine (Invitrogen), transferrine ($13,75\mu\text{g/mL}$), insuline ($25\mu\text{g/mL}$), sélénite de sodium ($16,75\mu\text{g/mL}$), pyruvate de sodium ($0,275\mu\text{g/mL}$) (Invitrogen), albumine bovine (0,1%) (Invitrogen), pénicilline (50 U/mL) et streptomycine ($50\mu\text{g/mL}$) (Invitrogen). Initialement, le milieu de culture a été enrichi en facteurs de croissance pendant 5 jours afin de permettre la prolifération des OPC par les facteurs de croissance bFGF (basic fibroblast growth factor) (10ng/mL) (Sigma) et PDGF-AA (platelet-derived growth factor-AA) (10ng/mL) (Peprotech, Londres)(25). Les cultures ont été incubées dans un incubateur à 37°C avec 5% de CO_2 et saturé en humidité. Les milieux ont été changés de moitié tous les jours jusqu'au 5^{ème} jour de culture. A partir du 5^{ème} jour de culture, le milieu a été remplacé par du milieu dépourvus de bFGF et PDGF-AA et a été changé complètement tous les deux jours jusqu'à la fin de la culture.

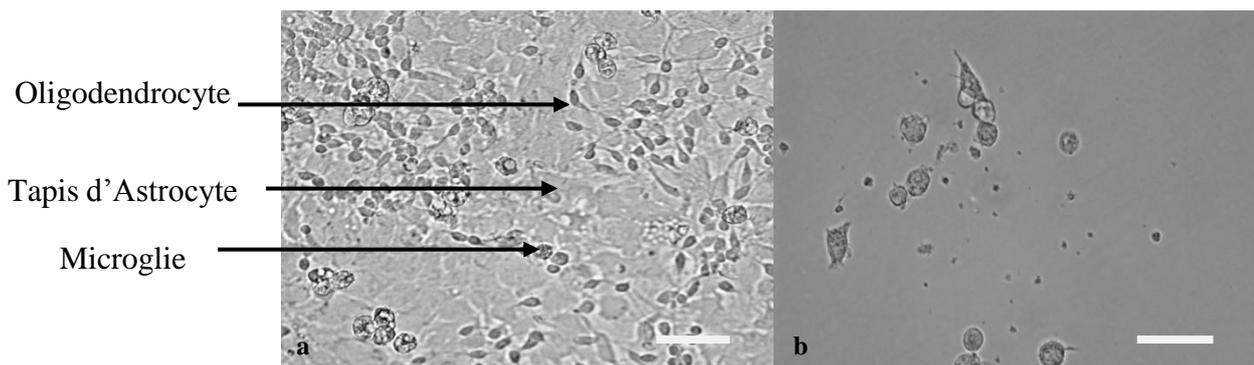


Figure 11 : a) Culture mixte d'astrocytes et oligodendrocytes après 10 jours de culture. b) Cellules microgliales adhérentes à la surface des boites de pétri non traitées lors de la séparation des cellules. — Barres d'échelles : $50\ \mu\text{m}$

3. Effet de la PGE2 sur les cultures cellulaires :

Cette étude porte sur l'action de la PGE2 sur la maturation oligodendrocytaire. Pour cela, nous avons ajouté dans le milieu à J4 de culture secondaire enrichie en oligodendrocytes une dose unique de PGE2 (Interchim, Montluçon, France) (Figure 13). La PGE2 a été stockée à -20°C par aliquot dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma) puis avant l'ajout aux cellules, elle a été diluée dans le milieu de culture afin de ne contenir plus que 0,1% de DMSO. Les cultures ont été divisées en trois groupes : un groupe contrôle qui recevait uniquement le véhicule c'est-à-dire du DMSO à 0,1%. Un groupe qui recevait de la PGE2 à 1nM et un groupe avec de la PGE2 à 10nM. Une culture préliminaire sans ajout de PGE2 nous a permis de définir notre schéma expérimental en repérant les différents stades morphologiques de développement oligodendrocytaire (Figure 12).

- Le premier temps (T0) correspond au 4ème jour de culture secondaire, temps où les OPC, oligodendrocytes bipolaires sont majoritaires. C'est à ce temps que la PGE2 est ajoutée au milieu de culture.

- A J6 de culture (T1), 24h après avoir enlevé les facteurs de croissance bFGF et PDGF-AA soit 48h après le temps T0, les pré-oligodendrocytes multipolaires deviennent majoritaires.

- A J7 de culture (T2), les oligodendrocytes multi-ramifiés apparaissent. Ils sont dits immatures car ne produisent pas de myéline.

- A J9 de culture (T3), les oligodendrocytes matures présentent de nombreuses ramifications et les premières feuilles de myéline sont visibles.

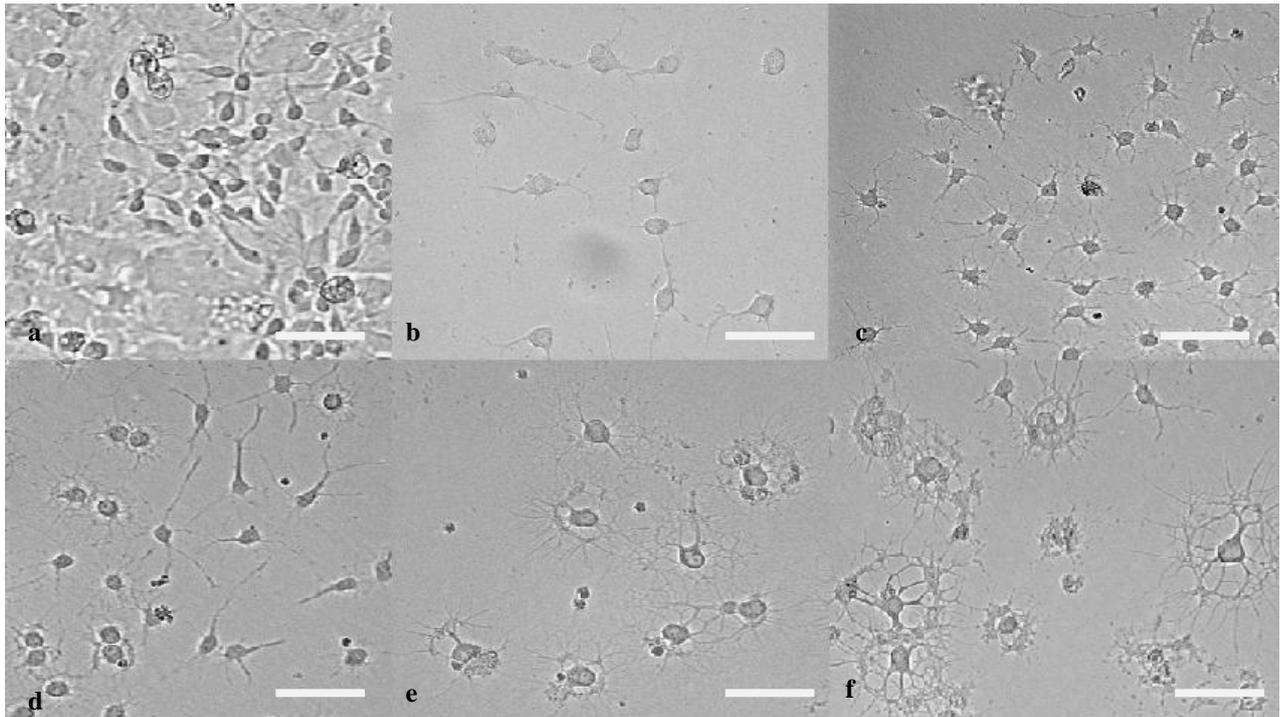


Figure12 : Culture primaire d'astrocyte et oligodendrocyte (a) et culture secondaire enrichie en oligodendrocytes après séparation (b), à T0 (c), à T1 (d), à T2 (e) et à T3 (f).

— Barres d'échelles : 100 μ m

L'ajout de facteurs de croissance (bFGF et PDGF-AA) pendant les 5 premiers jours de la culture secondaire a permis la prolifération et la synchronisation des cellules pour obtenir des cultures contenant majoritairement des OPC. L'exposition à la PGE2 ou à son véhicule est réalisée à partir de J4 de culture secondaire pendant 24 heures.

L'effet de la PGE2 sur la maturation oligodendrocytaire a été mesuré par immunocytochimie et par RT-PCR semi-quantitative en temps réel aux quatre temps expérimentaux définis (Figure 13). L'effet de la PGE2 sur la cinétique d'expression de ses récepteurs EP a également été étudié par RT-PCR aux 4 temps expérimentaux (T0, T1, T2, T3) selon le protocole décrit.

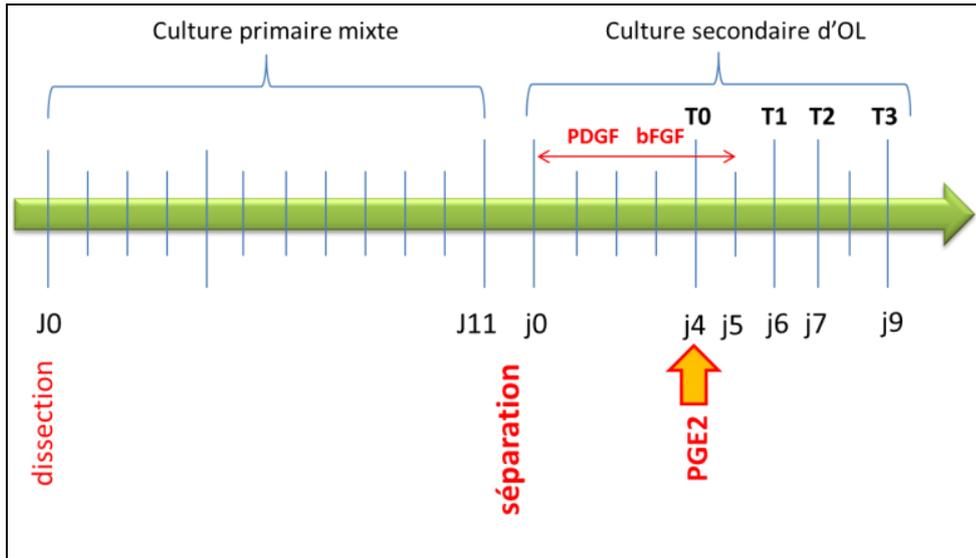


Figure 13 : Schéma expérimental.

B. Immunocytochimie

Les anticorps primaires utilisés pour l'immunocytochimie ainsi que leurs concentrations sont rapportés dans le tableau 1. A J4 (T0), J6 (T1), J7(T2) et J9 (T3) de culture secondaire enrichie en oligodendrocytes, les cellules ont été fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes puis stockées dans du tampon phosphate salin (PBS) (Invitrogen) à 4°C. Les sites non spécifiques de fixation des anticorps ont été bloqués par ajout de tampon contenant du PBS, 10% de sérum d'âne (Sigma) et 0,4% de triton 100X (Invitrogen) pour perméabiliser les cellules si la cible de l'anticorps est intracellulaire. Les anticorps primaires ont ensuite été mis en contact avec les cellules pendant 1h après dilution dans du tampon contenant du PBS avec 5% de sérum d'âne, et 0,4% de triton 100X en cas d'antigène intracellulaire. Après rinçage au PBS, les anticorps secondaires correspondants dilués dans le même tampon (tableau 1) ont été ajoutés, permettant de mettre en évidence par fluorescence les anticorps primaires. Après lavage au PBS puis à l'eau bi-distillée (milliQ), les lamelles ont été montées sur des lames en verre avec une goutte de solution de montage contenant du 4',6'-diamidino-2-phényllindole (DAPI) (Prolong® Gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen), marqueur des noyaux cellulaires. Les lames d'immunocytochimie ont été observées à l'aide d'un microscope à fluorescence (Digital inverted microscope, Evos). La maturation oligodendrocytaire sous l'effet de la PGE2 a été évaluée par immunocytochimie sur 4 cultures différentes. Pour chaque condition de traitement, les comptages sont réalisés à 3 endroits différents de la lamelle sur une surface de $0,1\text{mm}^2$ pour chaque comptage. Les images d'immunocytochimie ont été relues et interprétées par 2 expérimentateurs différents. Les comptages ont été réalisés au moyen du logiciel Image J.

4. Caractérisation de la pureté des cultures

L'anticorps anti-gliial fibrillary acidic protein (GFAP) (DAKO, Glostrup, Denmark) utilisé comme marqueur des astrocytes est un marqueur intracellulaire tandis que l'anticorps anti-Olig2 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), pour les oligodendrocytes, est un marqueur nucléaire.

5. Marquage de la différenciation oligodendrocytaire

L'anticorps anti-2',3'-cyclic nucléotide 3'-phosphodiesterase (CNPase), marqueur des oligodendrocytes immatures et l'anticorps anti-myelin basic protein (MBP) (Millipore, Temecula, USA), marqueur des oligodendrocytes matures, ont été dilués dans du tampon contenant du PBS avec 5% de sérum d'âne et 0,4% de triton 100X. Les anticorps anti-O4 (Volpe J.J., Boston, USA) marqueur des pré-oligodendrocytes et l'anticorps anti-A2B5 (Millipore) marqueur des OPC ont été dilués dans du PBS contenant 5% de sérum d'âne (Sigma) sans triton. Pour mettre en évidence le marquage par les anticorps anti-O4 et anti-A2B5 qui sont tous les deux des IgM, il a été nécessaire d'incuber les cellules avec un anticorps anti-IgM biotynilé dilué au 1/400 dans le même tampon que les anticorps primaires pendant 45 minutes.

Tableau 1

Nom	espèce	Type	provenance	dilution	Ac secondaire	provenance	Dilution
A2B5	Mouse	IgM	Millipore	1/500	Cy-3streptavidine	Sigma	1/2000
O4	Mouse	IgM	Gift from volpe J.J	1/1000	Cy-3streptavidine	Sigma	1/2000
CNPase	Mouse	IgG	Sigma	1/1000	547H donkey anti-mouse	Fluoprobes	1/1000
MBP	Mouse	IgG	Millipore	1/250	547H donkey anti-mouse	Fluoprobes	1/1000
OLIG2	Rabbit	IgG	BD Biosciences	1/500	488 donkey anti rabbit	Fluoprobes	1/1000
GFAP	Rabbit	IgG	DAKO	1/3000	488 donkey anti rabbit	Fluoprobes	1/1000

6. Comptage de la mortalité cellulaire

Les noyaux des cellules ont été marqués en bleu par le DAPI. Le comptage des noyaux pycnotiques à chaque temps expérimental a pu permettre d'évaluer le taux de mortalité de nos cultures en fonction de l'exposition à la PGE2 et du stade de maturation.

C. RT-PCR

1. Extraction d'ARN

L'ARN a été extrait à partir des cellules issues des cultures secondaires enrichies en oligodendrocytes à J4 (T0), J6 (T1), J7 (T2), et J9 (T3) de culture. Un mL de Trizol (Sigma) a été ajouté dans chaque puits après retrait du milieu. Le lysat cellulaire a été homogénéisé par agitation-refoulement à l'aide d'une pipette. L'ARN a soit été extrait d'emblée, soit les lysats ont été stockés à -80°C en attendant d'être utilisés. Le lysat a été de nouveau mélangé par agitation (vortex) puis de nouveau par pipetage-refoulement. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, 200 µL de chloroforme (VWR, West Chester, Pennsylvanie, USA) ont été ajoutés puis le tube a été agité vigoureusement. Le mélange a été incubé 3 minutes à température ambiante puis centrifugé 15 minutes à 12000g et 4°C. La phase aqueuse contenant les ARN a été transférée dans un nouveau tube avant ajout de 500 µL d'isopropanol (Carlo Erbra Reagents, France) pour précipiter les ARN. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante et une centrifugation de 5 minutes à 12000 g et 4°C, le surnageant a été retiré. Un mL d'éthanol 75% a été ajouté au culot pour laver les ARN. La solution a été centrifugée 5 minutes à 7500g et 4°C puis le surnageant a été retiré et le culot séché sous vide pendant 5 minutes. Enfin le culot d'ARN a été resuspendu dans 20 µL d'eau bi-distillée (MilliQ) avant incubation de 2 minutes à température ambiante. La concentration d'ARN a été déterminée grâce au spectromètre Nanodrop 2000® (Labtech, Palaiseau, France). L'ARN a été conservé à -20°C.

2. RT-PCR

- Traitement des ARN à la DNase

500 ng d'ARN ont été dilués dans 10 µL d'eau bi-distillée, puis 1 µL de DNase I et 1 µL tampon 10X (Invitrogen) sont ajoutés. Après mélange, la solution a été incubée 15 minutes à température ambiante. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 25 nM d'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) (Invitrogen) suivi d'une incubation de 10 minutes au bain-marie à 65°C.

- Transcription Inverse

230 ng d'ARN traités à la DNase ont été mélangés à 0,5 µL de transcriptase inverse Super Script II (Invitrogen), du tampon 5X, 2,5 µL de Dithiothreitol, Invitrogen (DTT) (Invitrogen), 0,2 mmol/L d'un mélange de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) (Invitrogen), 0,5 µL d'amorces hexamères (Random primers, Invitrogen) et à de l'eau bi-distillée pour un volume final de 25 µL. Le programme de Transcription Inverse 42°C pendant 45 minutes, 92°C pendant 5 minutes puis un retour à 4°C sur un thermocycler Biometra (Labgene, Archamps, France) a été appliqué. Les acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc) ont été conservés à -20°C.

- PCR (polymerase chain reaction) quantitative :

Les ADN complémentaires issus de la transcription inverse ont été amplifiés par PCR semi quantitative après mise au point des conditions expérimentales sur un appareil LightCycler® 480 (Roche). Les amorces utilisées ont été rapportés dans le tableau 2. Le gène glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été choisi pour standardiser les résultats. Les réactions de PCR ont été réalisées dans des plaques de 384 puits dans un volume final de 10 µL comprenant 2,5 µL d'ADN complémentaires, 2 µL de solution

d'amorces sens et anti-sens à 10 pmol/μL, 5 μL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) et 0,5 μL d'eau bi-distillée. Chaque gène a été étudié en duplicat pour chacune des conditions des trois cultures sauf pour le gène GAPDH de référence qui a été étudié en triplicat. Le programme de PCR appliqué est divisé en trois étapes : 10 minutes à 95°C pour la dénaturation initiale, 47 cycles de 95°C pendant 10 secondes, 60°C pour l'hybridation pendant 30 secondes, 72°C pour l'élongation pendant 10 secondes et enfin 1 minute à 65°C pour l'élongation finale. Les résultats de PCR ont été analysés par le calcul du 2^{-ddCP} et sont exprimés par rapport à l'expression du gène GAPDH et normalisée par rapport à T0.

Tableau 2

NOM	SENS	ANTI-SENS
GAPDH	CTGCACCACCAACTGCTTAG	GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT
EP1	ACTAGTGCACGTGGGTCACTA	AAGAGGCCCGCAAGCAA
EP2	CGTGTACCTATTTGCTTTCA	CGATGGAGAGGTAGCGTTC
EP3	CTTTCCTGCTGTGCATTGGC	GGTACACGAGGATGACCACCG
EP4	TCTGCTCCATTCCGCTCGTG	TGGCCTGCAAATCTGGGTTTC
PDGFR α	GACGTTCAAGACCAGCGAGTT	CAGTCTGGCGTGCGTCC
CNPase	AGACAGCGTGGCGACTAGACT	GGGCTTCAGCTTCTTCAGGT
MBP	CCTGCCCCAGAAGTCGC	CTTGGGATGGAGGTTCGTGTTTC

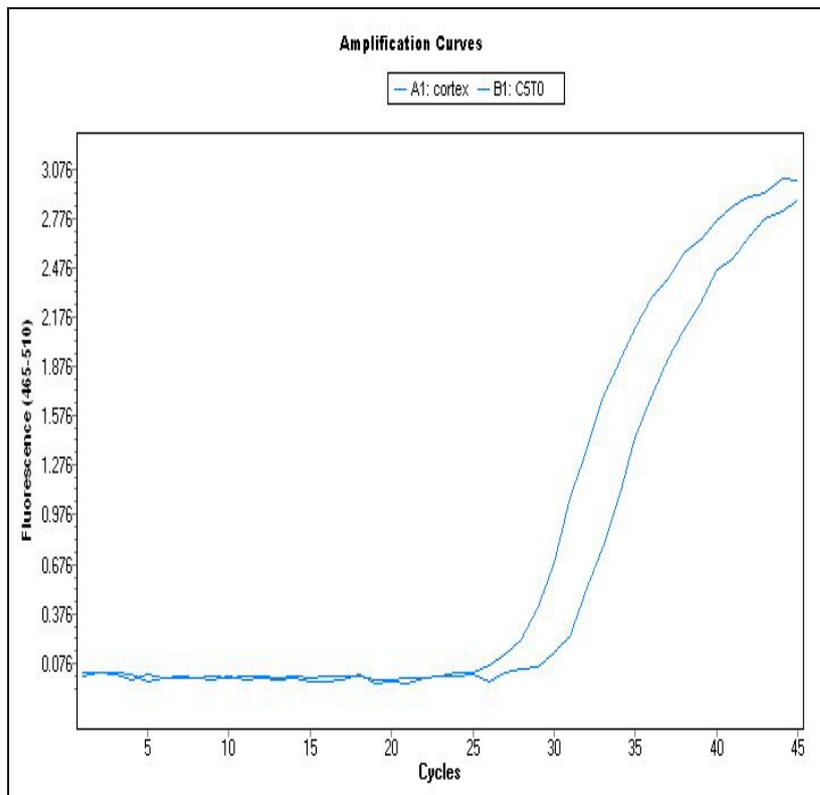
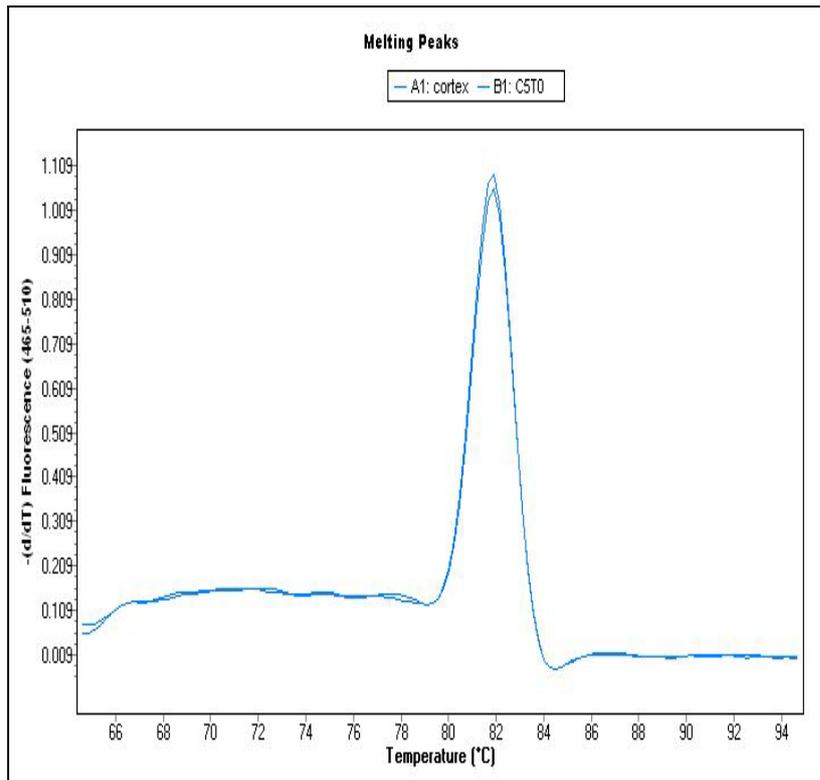


Figure 14 : Exemple de résultats de RT-PCR : a) Courbe d'amplification de PDGFR α . b) courbe de fusion de PDGFR α .

D. Analyse statistique

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SD pour chaque groupe : le groupe DMSO, le groupe PGE2 1nM et le groupe PGE2 10nM. L'étude statistique des résultats obtenus a été réalisée en utilisant le test one-way ANOVA et le test non paramétrique de Mann-Whitney à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 pour Windows. Les valeurs de $p < 0.05$ sont considérées comme significatives.

Résultats

A. Pureté des cultures secondaires d'OPC

Afin de caractériser la pureté des cultures enrichies en oligodendrocytes, les cellules ont été marquées par immunocytochimie. Les cultures contiennent des oligodendrocytes aux noyaux marqués par l'anticorps anti-Olig-2 et quelques astrocytes aux filaments gliaux marqués par l'anticorps anti-GFAP (Figure 15).

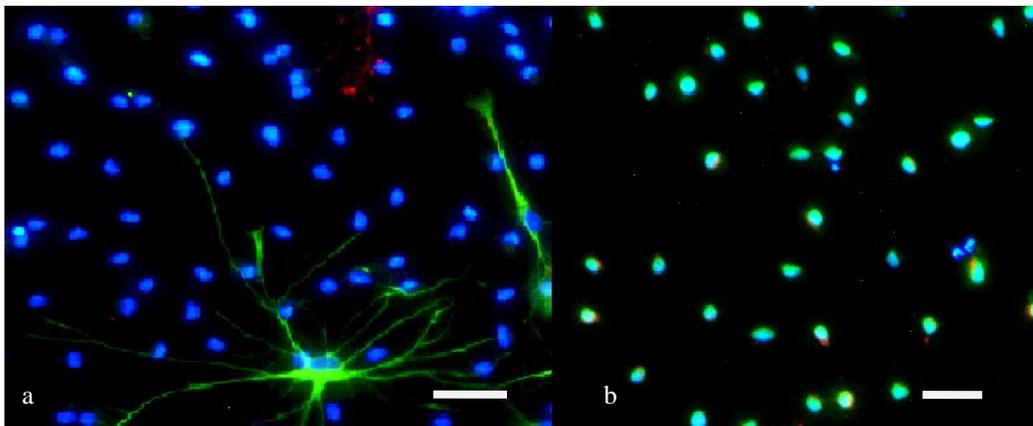


Figure 15 : Culture secondaire enrichie en oligodendrocytes : a) Marquage des noyaux en bleu et des astrocytes en vert (GFAP, localisation cytoplasmique). b) Marquage de tous les noyaux en bleu et des noyaux des oligodendrocytes en vert (Olig-2, localisation intranucléaire).

— Barres d'échelles : 50 µm

Après comptage des différents types cellulaires à T1, nous retrouvons dans notre culture en moyenne 2.3% d'astrocytes, et 7.6% de cellules non marquées qui peuvent être de la microglie résiduelle. Le taux de pureté en oligodendrocytes de nos cultures secondaires est de 90.1% (Figure 16).

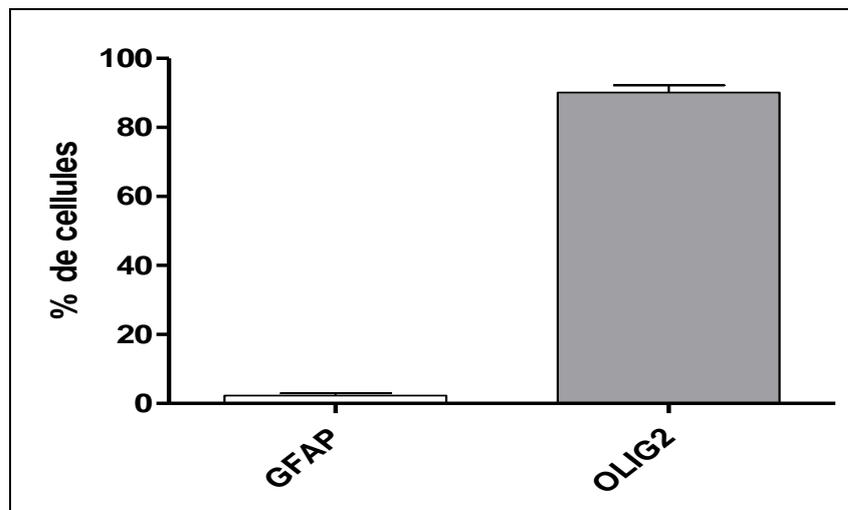


Figure 16 : pourcentage dans nos cultures de cellules marquées en immunocytochimie par l'anticorps anti-GFAP (astrocytes) et par l'anticorps anti-OLIG2 (oligodendrocytes).

B. Effet de la PGE2 sur la maturation oligodendrocytaire

Nous avons testé l'effet de la PGE2 sur la maturation des oligodendrocytes en culture en ajoutant la PGE2 à différentes concentrations (1 nM et 10 nM) dans le milieu de culture à J4. Afin d'évaluer la cinétique de maturation, nous avons réalisé une immunocytochimie à l'aide de marqueurs spécifiques de chaque stade de différenciation oligodendrocytaire. Les OPC marqués par l'anticorps anti-A2B5, les pré-oligodendrocytes marqués par l'anticorps anti-O4, les oligodendrocytes immatures marqués par l'anticorps anti-CNPase et les oligodendrocytes matures marqués par l'anticorps anti-MBP, aux différents temps de culture T0 (J4), T1 (J6), T2 (J7) et T3 (J9).

1. Evolution des OPC

Les OPC sont marquées en immunocytochimie par l'anticorps anti-A2B5 de surface (Figure 18). Comme attendu leur nombre est majoritaire à T0 puis diminue significativement au cours du temps ($p < 0,0001$). Cette décroissance au cours du temps des progéniteurs A2B5+ est plus lente pour les cultures traitées par 10nM de PGE2 à T1, mais surtout pour les cultures traitées par 1nM de PGE2 à T1 et T2 (Figure 17) avec une différence significative.

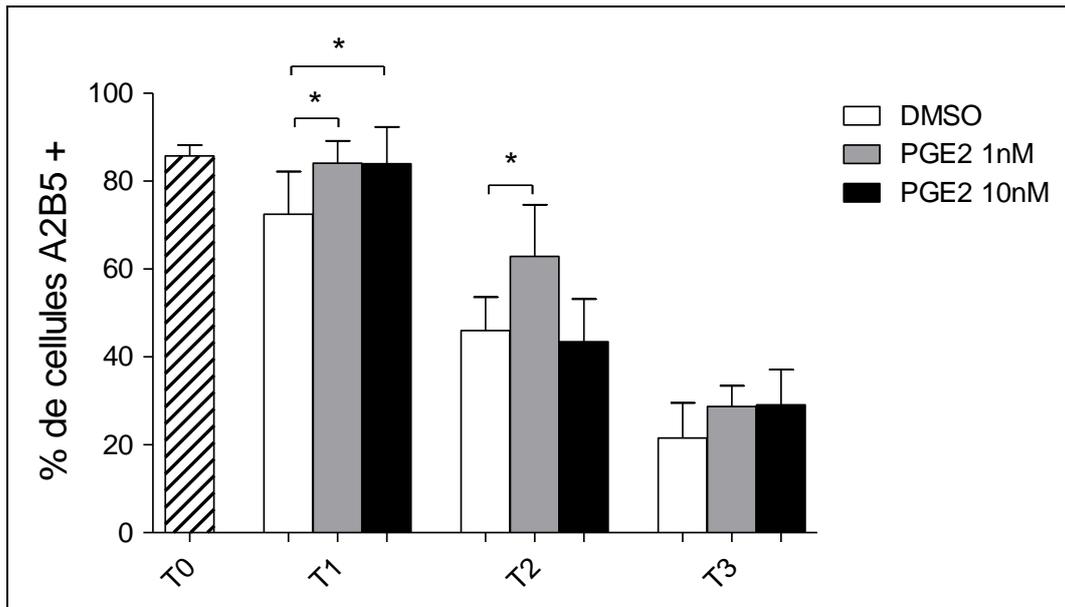


Figure 17 : Pourcentage de cellules marquées par l'anticorps anti-A2B5, marqueur des OPC aux différents temps de culture mis en évidence par immunocytochimie. Les astérisques indiquent une différence significative par analyse statistique utilisant un test one-way ANOVA complété d'un post-test non paramétrique de Mann-Whitney ; *, $p < 0,05$.

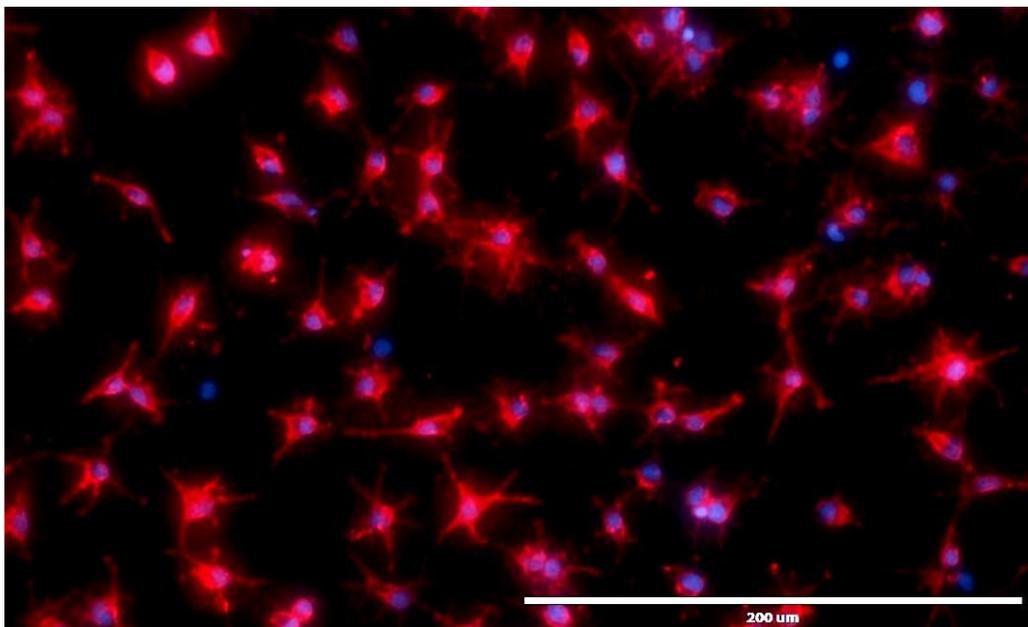


Figure 18 : Exemple de marquage cellulaire par l'anti-A2B5 en rouge des OPC et des noyaux marqués en bleu par le DAPI. — Barre d'échelle : 200 μm

Ces résultats ont été confrontés à l'expression du PDGFR α en RT-PCR qui est également un marqueur des OPC. On retrouve une forte expression du PDGFR α dans nos cultures secondaires d'oligodendrocytes à T0, qui s'effondre dès T1 sans modification de son niveau de transcription par la suite dans le groupe contrôle comme dans les groupes PGE2 1 et 10 nM (Figure 19). On note cependant un retard de diminution de l'expression de PDGFR α dans le groupe PGE2 1nM à T1 sans que cette différence soit significative par rapport aux autres groupes.

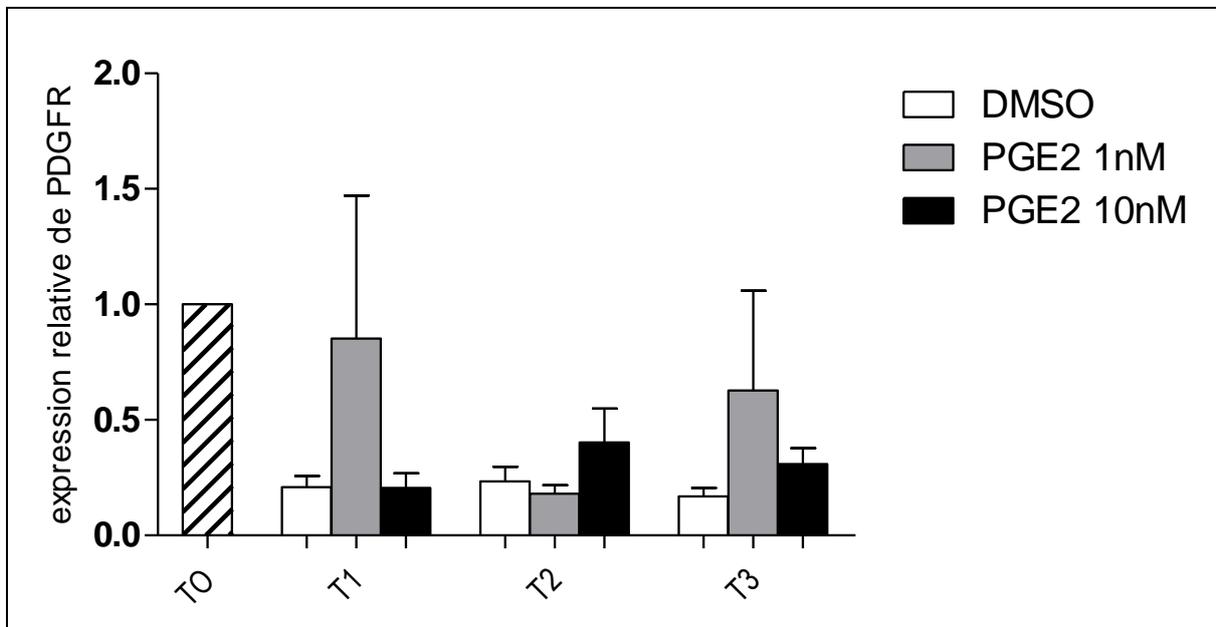


Figure19 : Expression relative du marqueur PDGFR α par rapport au gène de référence GAPDH normalisée par rapport à la condition T0, aux différents temps de culture.

2. Evolution des pré-oligodendrocytes O4+

L'anticorps de surface anti-O4 est un marqueur des formes intermédiaires de la maturation oligodendrocytaire c'est-à-dire les pré-oligodendrocytes tardifs. Morphologiquement, il s'agit de petites cellules avec plusieurs ramifications (Figure 20).

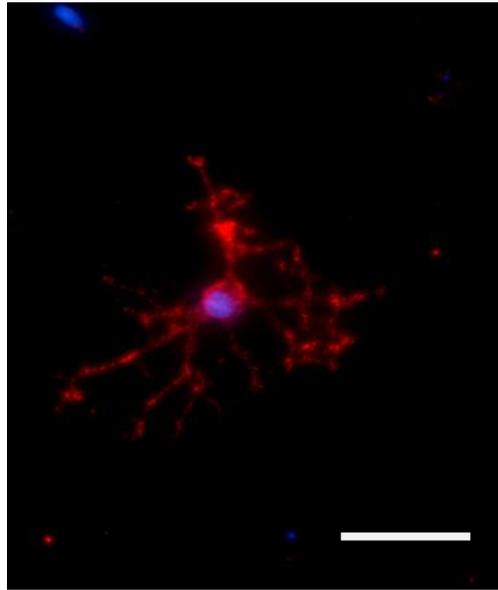


Figure 20 : Exemple de marquage par l'anticorps anti-O4 en immunocytochimie en rouge, noyaux marqués en bleu par DAPI. ——— Barre d'échelle : 50 μ m

La quantification des cellules O4+ reste stable dans le groupe contrôle du temps T0 à T3. La PGE2 influence cette cinétique avec un effet dosage dépendant entre la dose de 1 nM et de 10 nM. En effet, une augmentation significative et transitoire du nombre de cellules O4+ est notée à T1 et T2 dans le groupe PGE2 10 nM alors que cette ascension apparaît de manière significative qu'à T2 pour le groupe PGE2 1 nM. De plus, l'effet de la PGE2 1 nM sur la population des cellules O4+ semble se prolonger plus durablement à T3 (Figure 21).

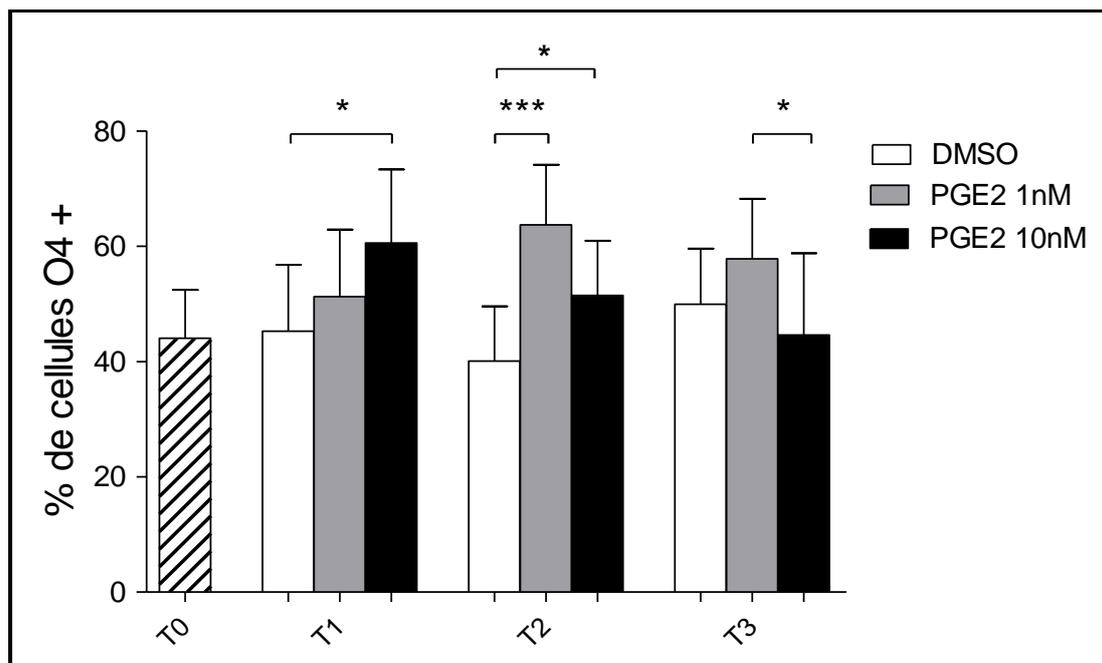


Figure 21 : Pourcentage de cellules marquées par l'anticorps anti-O4 aux différents temps de culture par immunocytochimie. Les astérisques indiquent une différence significative par analyse statistique utilisant un test one-way ANOVA complété d'un post-test non paramétrique de Mann-Whitney ; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,005$.

3. Evolution des oligodendrocytes immatures

Les oligodendrocytes immatures sont des oligodendrocytes ayant de nombreuses ramifications créant un réseau autour du corps cellulaire, il s'agit du stade ultime précédant la myélinisation. Par immunocytochimie à l'aide de l'anticorps intracytoplasmique anti-CNPase, nous avons pu étudier leur évolution au cours du temps et sous l'effet de la PGE2 (Figure 21).

On retrouve une diminution significative des oligodendrocytes immatures dans les groupes PGE2 1nM et 10nM par rapport au groupe DMSO au temps T2 (Figure 22).

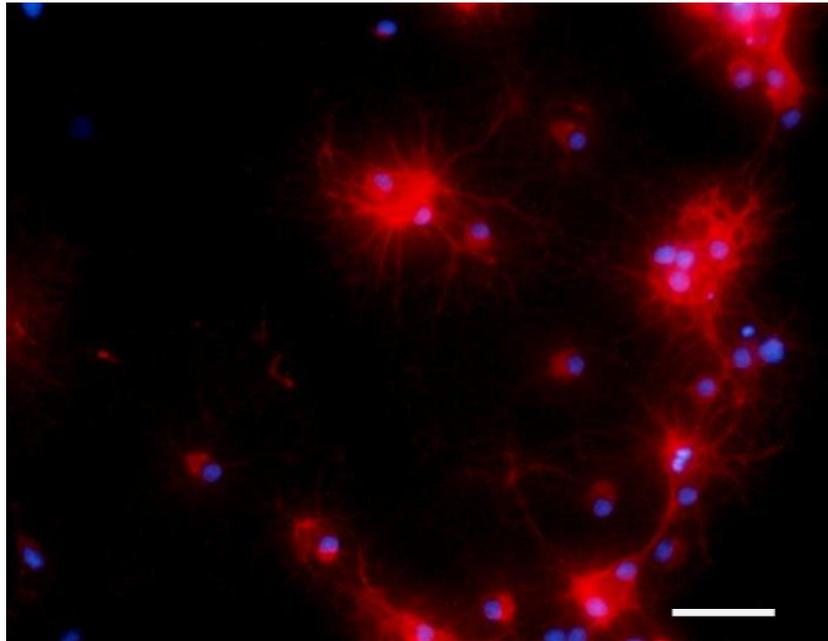


Figure 21 : Exemple de marquage des oligodendrocytes immatures par immunocytochimie avec l'anticorps anti-CNPase en rouge, noyaux marqués en bleu par DAPI. —, Barre d'échelle : 50 μ m

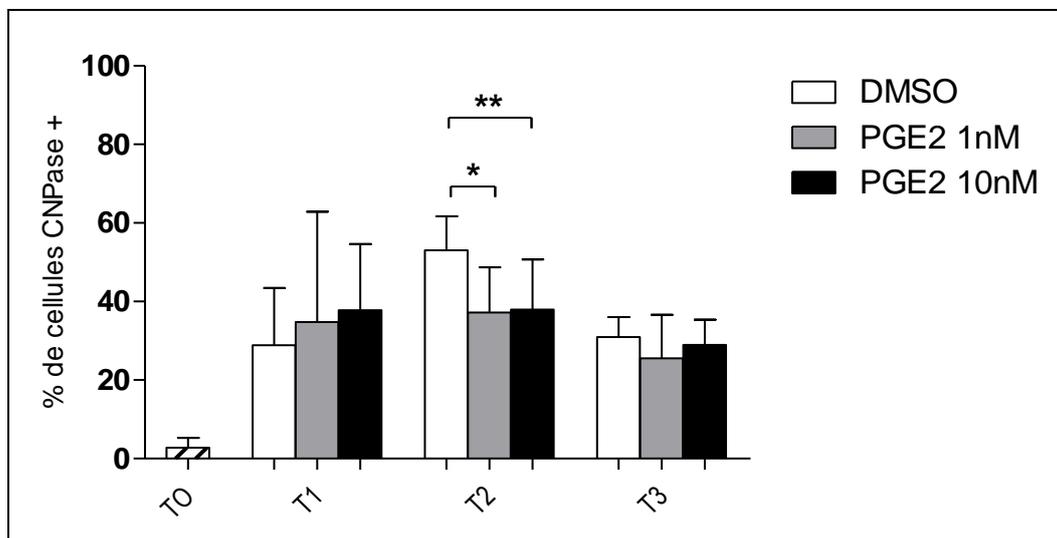


Figure 22 : Pourcentage de cellules marquées par l'anticorps anti-CNPase par immunocytochimie aux différents temps de culture. Les astérisques indiquent une différence significative par analyse statistique utilisant un test one-way ANOVA complété d'un post-test non paramétrique de Mann-Whitney ; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Ces résultats ont été confrontés à l'expression de CNPase en RT-PCR. On ne retrouve pas de différence d'expression de CNPase ni dans le temps ni en fonction de l'exposition à la PGE2 (Figure 23).

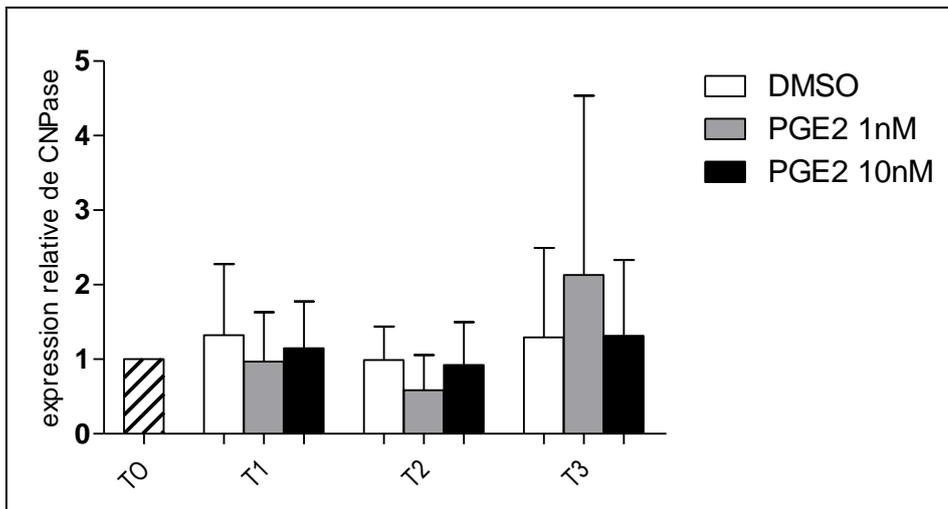


Figure 23 : Expression relative de CNPase en RT-PCR par rapport au gène de référence et normalisée par rapport à la condition T0.

4. Evolution des oligodendrocytes matures

Les oligodendrocytes matures sont appelés également oligodendrocytes myélinisants car ils produisent la myéline qui va permettre la conduction de l'influx nerveux de manière saltatoire le long de l'axone. La MBP est une protéine constituante de la myéline. Les oligodendrocytes sont marqués à ce stade de maturation par l'anticorps anti- MBP en immunocytochimie (Figure 24). L'expression de MBP a également été étudiée en RT-PCR.

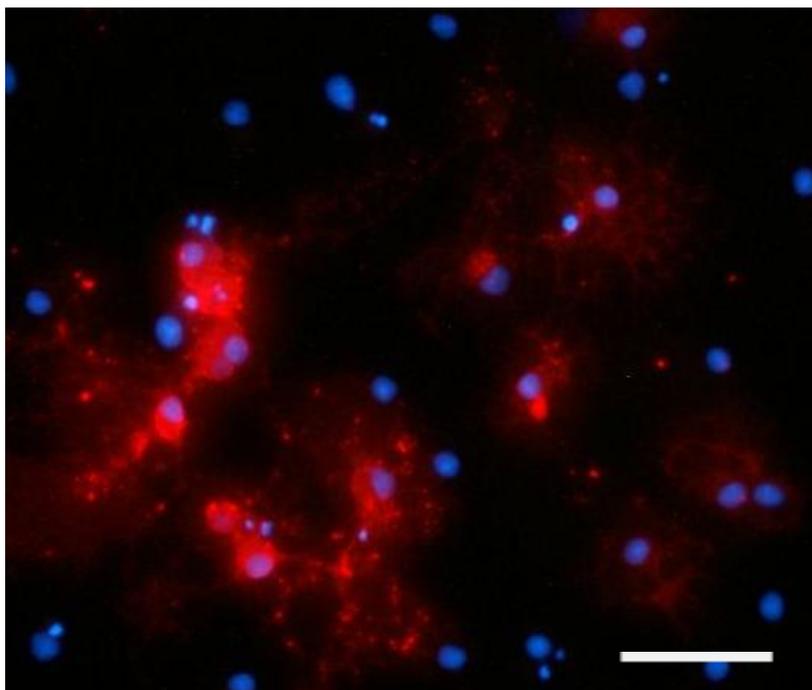


Figure 24 : Exemple de marquage des oligodendrocytes matures par l'anticorps anti-MBP en immunocytochimie en rouge, noyaux marqués en bleu par DAPI. — , Barre d'échelle : 50 μm .

On retrouve une augmentation du nombre de cellules marquées par l'anticorps anti-MBP (Figure 25) et une augmentation de l'expression de MBP dans nos cultures au cours du temps jusqu'à un maximum à T3 (Figure 26). Nous constatons une augmentation significative entre les groupes DMSO et PGE2 10nM à T2 et T3 alors que cette différence apparait plus tardivement entre les groupes DMSO et PGE2 1nM à T3 (Figure 25). On n'observe pas de différence quand on étudie l'expression relative de MBP en RT-PCR aux 4 temps de culture sous PGE2, cependant on note l'augmentation progressive de l'expression de MBP dans le temps pour chaque groupe ce qui valide nos résultats de RT-PCR (Figure 26).

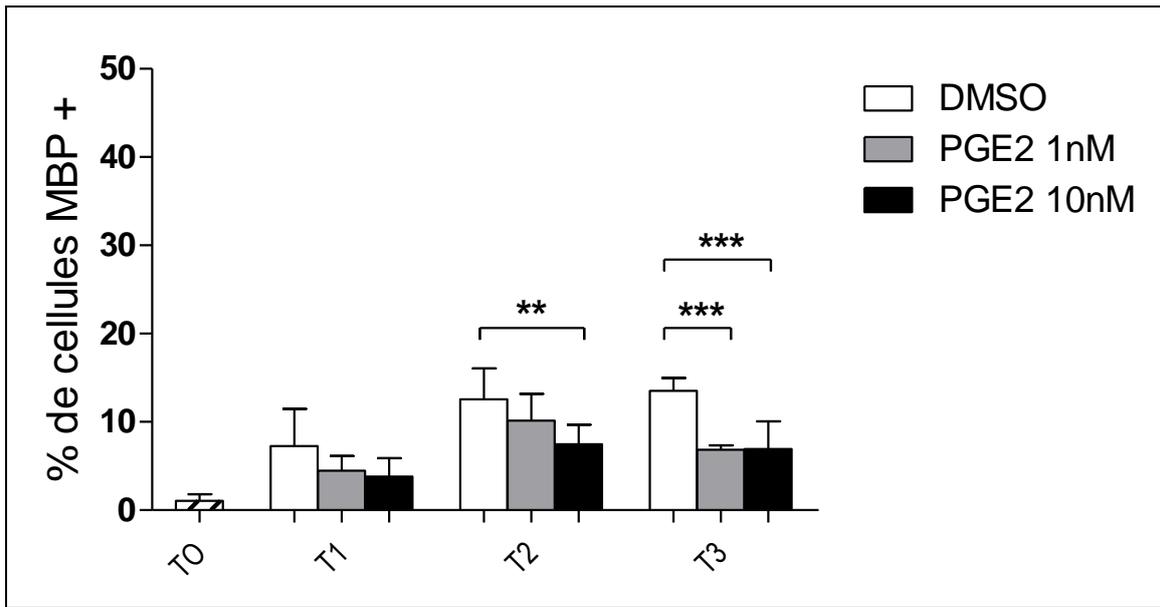


Figure 25 : Pourcentage de cellules marquées par l'anticorps anti-MBP en immunocytochimie aux différents temps de culture. Les astérisques indiquent une différence significative par analyse statistique utilisant un test one-way ANOVA complété d'un post-test non paramétrique de Mann-Whitney ; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$.

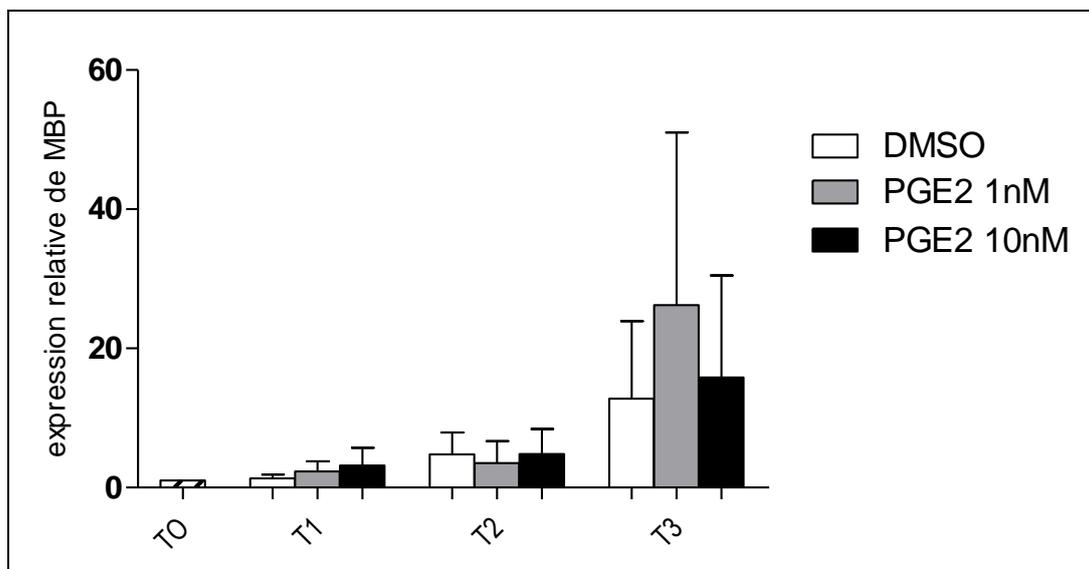


Figure 26 : Expression relative de MBP en RT-PCR au cours du temps dans les différents groupes par rapport au gène de référence GAPDH et normalisée par rapport au temps T0.

C. Effet de la PGE2 sur la mortalité cellulaire

La mortalité cellulaire a été étudiée en comptant les noyaux pycnotiques marqués par immunofluorescence par le DAPI (voir matériel et méthodes) à chaque temps de culture et dans chaque groupe DMSO, PGE2 1nM et 10nM (Figure 28). Le pourcentage de noyaux pycnotiques augmente avec le temps de culture passant de 4% à T0 jusqu'à un maximum de 27% à T3. On ne retrouve pas de différence entre les trois groupes à aucun temps de culture (Figure 27).

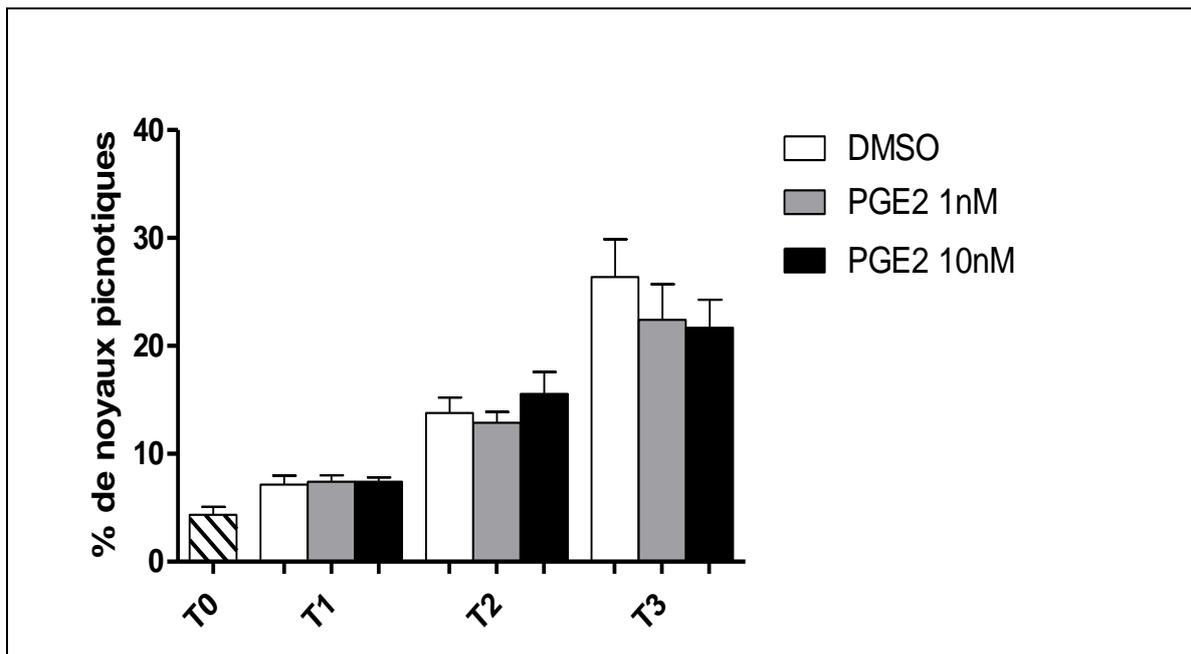


Figure 27 : Pourcentage de noyaux pycnotiques sur le nombre de noyaux total marqués par DAPI en immunofluorescence.

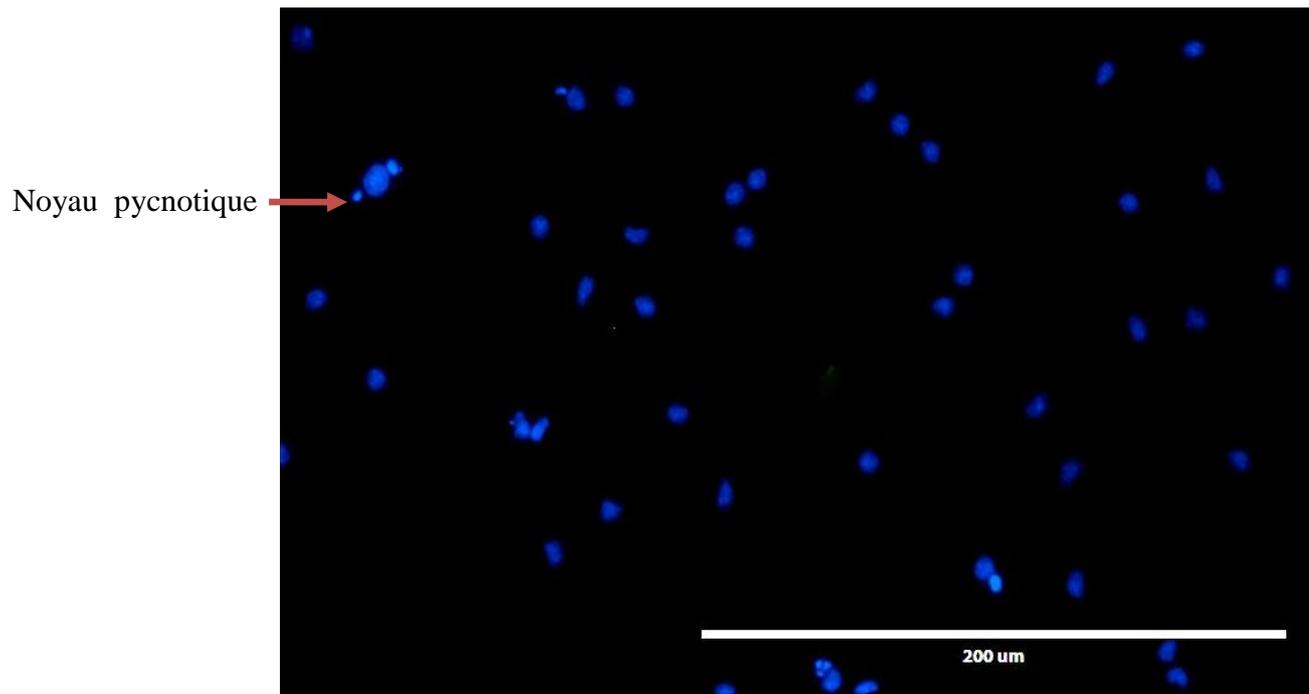


Figure 28 : Exemple de marquage par immunofluorescence des noyaux par le DAPI. ——— ,
Barre d'échelle : 200 μm .

D. Profils d'expression des récepteurs EP et influence de la PGE2

L'expression des différents récepteurs à la PGE2 a été vérifiée et retrouvée dans nos cultures d'oligodendrocytes (Figure 29).

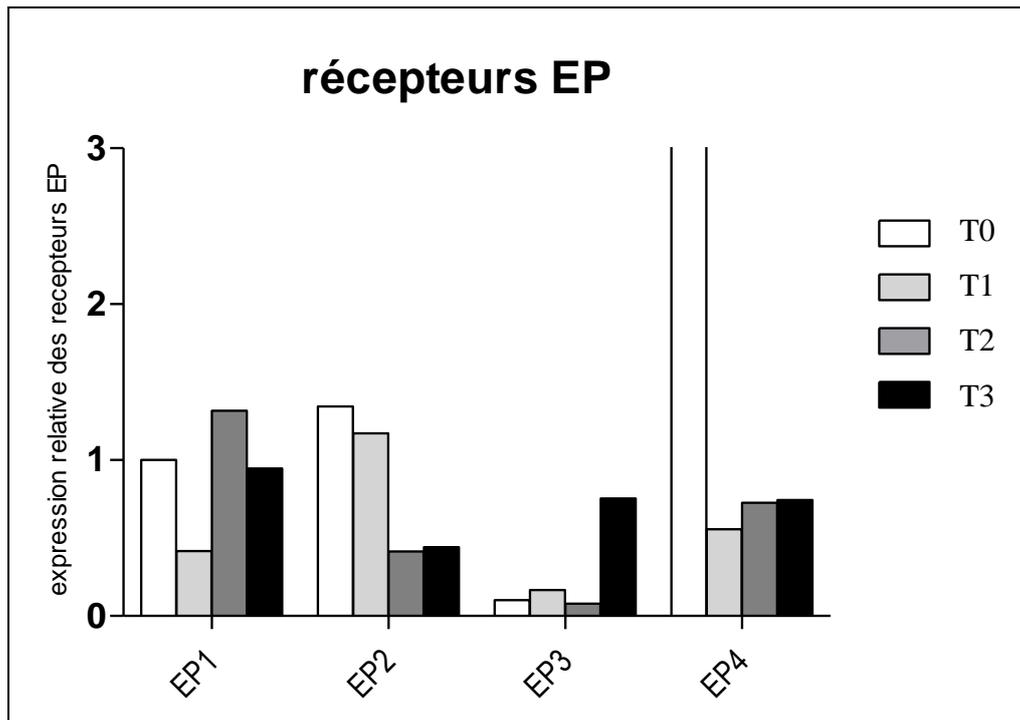


Figure 29 : Expression relative des récepteurs EP par rapport à GAPDH normalisée par rapport à EP1, in vitro en RT-PCR pour le groupe DMSO.

Leurs cinétiques d'expression varient au cours du temps et en fonction de l'administration de PGE2. Les profils d'expression d'EP2 et d'EP4 semblent relativement superposables dans le groupe contrôle avec une diminution plus ou moins franche de leurs transcriptions à partir de T1. A l'opposé, EP3 est peu exprimé dans les temps précoces pour être ensuite plus exprimés à T3. Le profil d'expression d'EP1 semble moins influencé par le temps de culture (Figure 29). Un effet potentiel de la PGE2 peut être noté à T1, T2 et T3 sur

l'expression du récepteurs EP4. En effet on constate une diminution significative à T1, T2 et T3 entre les groupes DMSO et PGE2 10nM et plus tardivement à T3 avec le groupe PGE2 1nM (Figure 30).

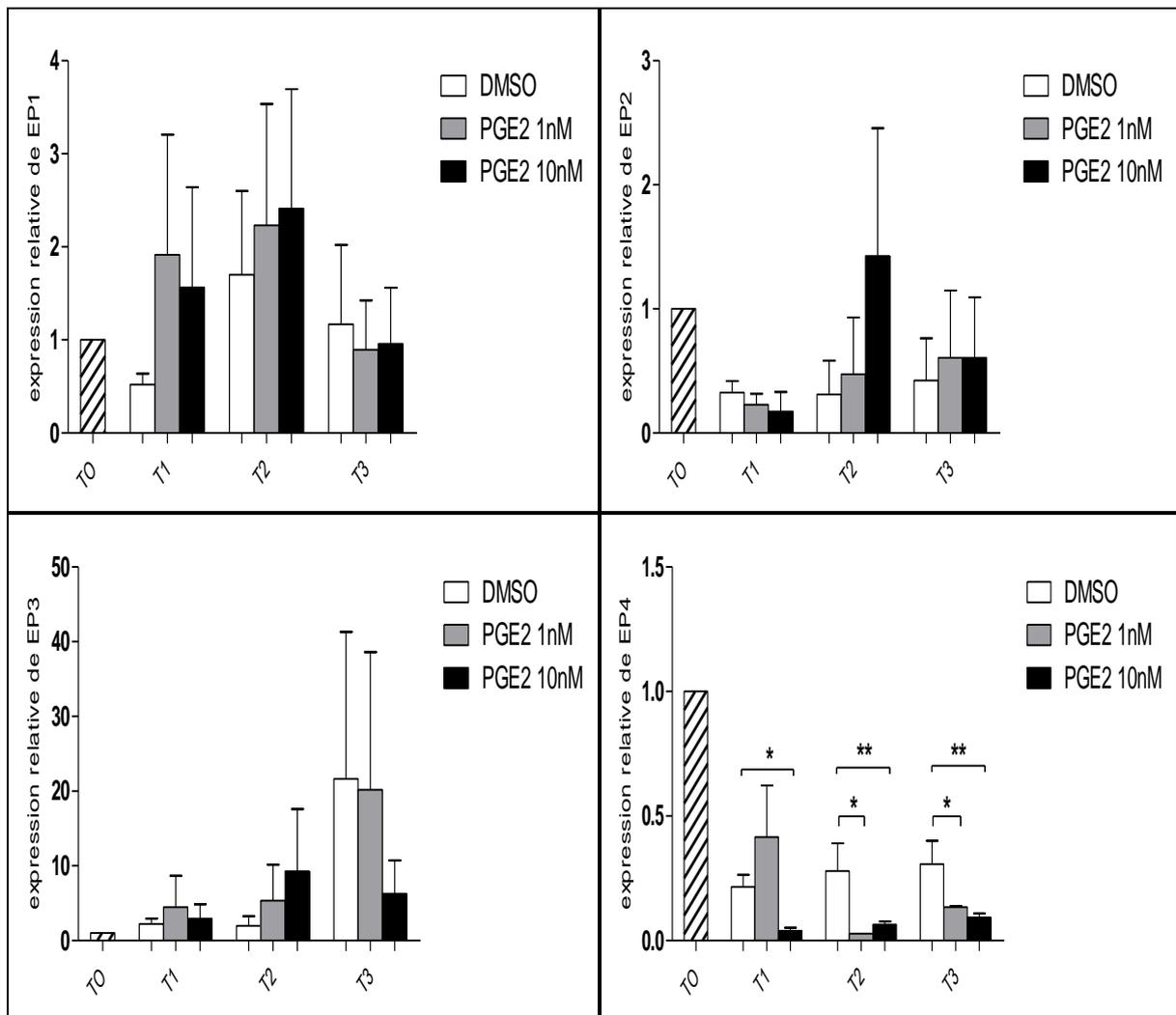


Figure 30 : Expression relative des récepteurs EP par rapport à la GAPDH, normalisée par rapport au temps T0 en RT-PCR. Les astérisques indiquent une différence significative par analyse statistique utilisant un test one-way ANOVA complété d'un post-test non paramétrique de Mann-Whitney ;*, $p < 0.05$. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

Discussion

Notre étude s'est attachée à mimer la situation d'un stress provoqué par un accouchement prématuré en contexte infectieux et son effet sur le système nerveux central du nouveau-né prématuré, principalement la lignée oligodendrocytaire. Pour cela, l'injection d'une dose unique de PGE2 in vitro à deux concentrations différentes sur des cultures enrichies en formes jeunes d'oligodendrocytes a été réalisée. Les principaux résultats observés sont :

- ✓ Une discrète augmentation des OPC et une augmentation significative des pré-oligodendrocytes sous l'influence de la PGE2 au temps précoce avec une cinétique de décroissance des OPC plus lente en présence de PGE2.
- ✓ Un défaut des formes immatures et myélinisantes au stade plus tardif sous l'influence de la PGE2.
- ✓ L'absence d'effet sur la mortalité des oligodendrocytes sous l'effet de la PGE2
- ✓ La confirmation de l'expression des 4 récepteurs à la PGE2 et leur variation au cours du temps pour EP1, 2 et 3.
- ✓ L'expression par l'oligodendrocyte d'EP4 est diminuée en présence de PGE2.

A. Discussion de la méthode

Pour ce projet, une culture enrichie en oligodendrocytes selon le protocole du laboratoire d'accueil dérivé de la méthode de Labourdette (61) a d'abord été réalisée. Mais devant le trop faible rendement en oligodendrocytes et la grande contamination par d'autres cellules, il a été convenu de mettre au point un nouveau protocole de culture secondaire enrichie en oligodendrocytes. La culture a été mise au point à partir du protocole de Chen (60), dérivé de la méthode de Mc Carthy et De Vellis (59).

Les différents temps ont été définis par analyse morphologique de cultures préliminaires. Les principales modifications secondaires à la PGE2 ont lieu dès le temps précoce c'est-à-dire T1. La PGE2 aurait donc un effet rapide sur l'oligodendrocyte. Un temps T1 plus précoce, à 24h de l'injection de la PGE2 par exemple, aurait pu permettre l'apparition de modifications plus précoces qui peuvent être passées ici inaperçues ou atténuées.

Pour notre étude, la PGE2 a été injectée en une dose unique afin de mimer un stress aigu, il serait intéressant de confronter ces résultats à une situation où la PGE2 serait injectée dans le milieu à doses répétées et régulières afin de reproduire un stress chronique. De plus, il a été décidé d'injecter la dose de PGE2 à T0, stade où les OPC prédominent. Mais il serait également intéressant de contrôler l'effet de la PGE2 au temps T1, où les stades intermédiaires notamment les pré-oligodendrocytes, cibles de la LPV du nouveau-né prématuré, sont majoritaires.

Les concentrations de PGE2 ont été choisies en fonction de l'affinité des récepteurs pour la PGE2 ($EP1$ ($k_d=20nM$) < $EP2$ ($k_d=12 nM$) < $EP4$ ($k_d=2 nM$) < $EP3$ ($k_d=1 nM$) chez le rongeur) (51). Ainsi, à la dose de 1 nM, on peut s'attendre à ce que l'effet observé sur la maturation oligodendrocytaire soit essentiellement médié par $EP3$, voire $EP2$ alors qu'à 10

nM, EP3, EP2 et éventuellement EP4 peuvent intervenir. Il serait intéressant d'étudier l'effet de la PGE2 à des doses plus élevées tel que 50 ou 100nM.

B. Discussion des résultats

1. PGE2 et maturation oligodendrocytaire

La PGE2 semble entraîner une augmentation des OPC et des pré-oligodendrocytes aux temps précoces et parallèlement un défaut de formes immatures et matures au stade tardif. En parallèle, nous avons étudié la mortalité de nos cellules en cultures sous l'action de la PGE2 et nous n'avons pas retrouvé de surmortalité sous PGE2. Ces modifications de cinétique de maturation des oligodendrocytes au cours du temps sous PGE2 pourrait traduire un blocage de la maturation oligodendrocytaire et de la myélinisation. Cependant, Il manque dans notre travail à étudier la cinétique de prolifération des oligodendrocytes et de vérifier que la PGE2 n'agit pas par une augmentation de la prolifération des formes jeunes au dépend des formes tardives. Ces résultats sont compatibles avec ceux obtenus dans un modèle murin *in vivo* d'atteinte diffuse de la myélinisation consécutif à une inflammation systémique néonatale (45), mais également dans une étude clinique chez le nouveau-né (62). Dans cette dernière étude, une série rétrospective de cerveau de nouveau-né atteint de LPV a été comparé à une analyse prospective de cas présentant une forme diffuse de LPV à l'IRM. L'autopsie et l'étude des cerveaux de ces nouveau-nés a permis de mettre en évidence une augmentation des pré-oligodendrocytes en défaveur des oligodendrocytes matures. Cet effet se fait sans modification du nombre de cellules marquées par Olig2, marqueur de la lignée oligodendrocytaire. Ces constatations confirment le blocage de myélinisation mais ne permettent pas de statuer sur le caractère définitif ou temporaire de ce blocage (62) qui serait

alors dans ce cas un ralentissement de maturation. Ainsi, notre travail permet d'impliquer la PGE2 comme médiateur intra-cérébral de l'inflammation susceptible d'induire directement les atteintes de la lignée oligodendrocytaire observées dans les leucoencéphalopathies diffuses du prématuré. La PGE2 pourrait également être impliquée dans d'autre pathologie de la myéline et devenir un axe de recherche intéressant.

L'expression retrouvée des marqueurs des formes jeunes (PDGFR α) et matures (MBP) des oligodendrocytes ont une cinétique d'expression dans le groupe contrôle qui concorde avec les données de la littérature (63) et avec nos résultats d'immunocytochimie. Ces résultats valident notre méthode de RT-PCR.

2. PGE2 et expression de ces récepteurs

Dans la littérature, les récepteurs EP2 et 4 sont cités comme neuroprotecteurs (54)(53)(55) alors que EP1 et EP3, comme neurotoxiques (57)(58)(56).

Les expressions des 4 récepteurs à la PGE2 chez l'oligodendrocyte ont été confirmées par notre étude et il semblerait qu'au temps T1 (stade où les pré-oligodendrocytes prédominent) les récepteurs EP2 et EP4 soient les plus exprimés. Or, c'est justement l'expression du récepteur EP4 à T1 qui semble être affaiblie par l'injection préalablement de 10nM de PGE2. Dans la littérature, EP2 et EP4 sont connus pour être neuroprotecteurs. Si l'expression d'EP4 est diminuée par la PGE2, on pourrait alors penser que les effets toxiques de l'inflammation sur la substance blanche du nouveau-né prématuré peuvent s'expliquer en partie par un défaut d'expression des récepteurs neuroprotecteurs.

D'autre part, EP2 et EP4 ont des cinétiques d'expression très variables dans le temps avec un pic d'expression précoce à T0 tandis qu'EP3 et EP1 dans des mesures moindres, sont

exprimés plus faiblement. L'injection de PGE2 à T1, stade où l'expression d'EP2 et 4 in vitro est moins importante, plutôt qu'à T0 pourrait entraîner des modifications plus importantes sur la lignée oligodendrocytaire. Cependant, il s'agit encore de résultats préliminaires qui demandent à être confirmés. D'autre part, nous avons quantifié les ARN messagers de ces différents récepteurs. Il faudrait pour vérifier nos hypothèses, étudier la synthèse et la fonctionnalité de ces récepteurs à la membrane de la cellule.

C. Conclusion

En conclusion, notre étude a permis de mettre en évidence un effet significatif de la PGE2 sur la maturation oligodendrocytaire. La PGE2 engendrerait un défaut de la maturation oligodendrocytaire. Dans un premier temps, il serait bon de confirmer ces résultats en renouvelant les expériences décrites. Secondairement, les perspectives à cette étude seraient d'étudier l'effet de la PGE2 sur la prolifération des oligodendrocytes in vitro et sur la maturation à plus long terme. Ceci afin de cerner au mieux les conséquences induites par la PGE2 et préciser le caractère définitif ou temporaire du blocage de maturation. Parallèlement, l'existence des récepteurs sur la membrane des oligodendrocytes devra être confirmée par immunocytochimie ou Western blot. Enfin les mécanismes moléculaires d'action de la PGE2 via ses récepteurs pourraient être étudiés par l'intermédiaire d'agonistes ou antagonistes de chaque récepteur. Notamment l'action du récepteur EP4 dont l'expression semble être la plus sensible à l'action de la PGE2.

Bibliographie.

1. Blondel B, Supernant K, Du Mazaubrun C, Bréart G. Enquête nationale périnatale 2003. Paris. 2005;<http://www.sante.gouv.fr/html/dossiers/perinat03/sommaire.htm>.
2. Buitendijk S, Zeitlin J, Cuttini M, Langhoff-Roos J, Bottu J. Indicators of fetal and infant health outcomes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2003 nov;111:S66–S77.
3. Larroque B, Bréart G, Kaminski M, Dehan M, André M, Burguet A, et al. Survival of very preterm infants: EpiPAGE, a population based cohort study. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2004 janv 3;89(2):F139–F144.
4. Larroque B, Marret S, Ancel P-Y, Arnaud C, Marpeau L, Supernant K, et al. White matter damage and intraventricular hemorrhage in very preterm infants: the EPIPAGE study. *J. Pediatr*. 2003 oct;143(4):477–83.
5. Larroque B, Ancel P-Y, Marret S, Marchand L, André M, Arnaud C, et al. Neurodevelopmental disabilities and special care of 5-year-old children born before 33 weeks of gestation (the EPIPAGE study): a longitudinal cohort study. *The Lancet*. 2008 mars;371(9615):813–20.
6. Ancel P-Y. Severe sensorineural impairment in very premature infants: epidemiological aspects. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2004 oct;33(6 Pt 1):461–74.
7. Delobel-Ayoub M, Arnaud C, White-Koning M, Casper C, Pierrat V, Garel M, et al. Behavioral Problems and Cognitive Performance at 5 Years of Age After Very Preterm Birth: The EPIPAGE Study. *Pediatrics*. 2009 janv 6;123(6):1485–92.
8. Wilson-Costello D, Friedman H, Minich N, Siner B, Taylor G, Schluchter M, et al. Improved Neurodevelopmental Outcomes for Extremely Low Birth Weight Infants in 2000–2002. *Pediatrics*. 2007 janv 1;119(1):37–45.
9. Banker BQ, Larroche JC. Periventricular leukomalacia of infancy. A form of neonatal anoxic encephalopathy. *Arch. Neurol*. 1962 nov;7:386–410.
10. Khwaja O, Volpe JJ. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed*. 2008 mars;93(2):F153–161.
11. Riddle A, Dean J, Buser JR, Gong X, Maire J, Chen K, et al. Histopathological correlates of magnetic resonance imaging–defined chronic perinatal white matter injury. *Annals of Neurology*. 2011 juill 27;70(3):493–507.
12. Maalouf EF, Duggan PJ, Counsell SJ, Rutherford MA, Cowan F, Azzopardi D, et al. Comparison of findings on cranial ultrasound and magnetic resonance imaging in preterm infants. *Pediatrics*. 2001 avr;107(4):719–27.

13. Pierson CR, Folkerth RD, Billiards SS, Trachtenberg FL, Drinkwater ME, Volpe JJ, et al. Gray matter injury associated with periventricular leukomalacia in the premature infant. *Acta Neuropathol.* 2007 déc;114(6):619–31.
14. Saliba E, Marret S. Cerebral white matter damage in the preterm infant: pathophysiology and risk factors. *Semin Neonatol.* 2001 avr;6(2):121–33.
15. Boylan GB, Young K, Panerai RB, Rennie JM, Evans DH. Dynamic cerebral autoregulation in sick newborn infants. *Pediatr. Res.* 2000 juill;48(1):12–7.
16. Inage YW, Itoh M, Takashima S. Correlation between cerebrovascular maturity and periventricular leukomalacia. *Pediatr. Neurol.* 2000 mars;22(3):204–8.
17. Dammann O, Kuban KCK, Leviton A. Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage, and cognitive limitations in children born preterm. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews.* 2002 janv 1;8(1):46–50.
18. Wu YW, Colford JM. Chorioamnionitis as a Risk Factor for Cerebral Palsy A Meta-Analysis. *JAMA.* 2000 sept 20;284(11):1417–24.
19. Adams-Chapman I, Stoll BJ. Neonatal infection and long-term neurodevelopmental outcome in the preterm infant. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2006 juin;19(3):290–7.
20. Dammann O. [Intrauterine infection and the preterm brain: dimensions of aetiology research]. *Z Geburtshilfe Neonatol.* 2006 févr;210(1):1–5.
21. Perez Villegas EM, Olivier C, Spassky N, Poncet C, Cochard P, Zalc B, et al. Early specification of oligodendrocytes in the chick embryonic brain. *Dev. Biol.* 1999 déc 1;216(1):98–113.
22. Woodruff RH, Tekki-Kessarlis N, Stiles CD, Rowitch DH, Richardson WD. Oligodendrocyte development in the spinal cord and telencephalon: common themes and new perspectives. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2001 juill;19(4):379–85.
23. Raff MC, Abney ER, Miller RH. Two glial cell lineages diverge prenatally in rat optic nerve. *Dev. Biol.* 1984 nov;106(1):53–60.
24. Grinspan JB, Stern JL, Pustilnik SM, Pleasure D. Cerebral White Matter Contains PDGF-Responsive Precursors to O2A Cells. *J. Neurosci.* 1990 janv 6;10(6):1866–73.
25. McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalcq M, Aaronson SA. FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron.* 1990 nov;5(5):603–14.
26. Bansal R, Warrington AE, Gard AL, Ranscht B, Pfeiffer SE. Multiple and novel specificities of monoclonal antibodies O1, O4, and R-mAb used in the analysis of oligodendrocyte development. *J. Neurosci. Res.* 1989 déc;24(4):548–57.
27. Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late Oligodendrocyte Progenitors Coincide with the Developmental Window of Vulnerability for Human Perinatal White Matter Injury. *J. Neurosci.* 2001 févr 15;21(4):1302–12.

28. Matute C. Oligodendrocyte NMDA receptors: a novel therapeutic target. *Trends Mol Med.* 2006 juill;12(7):289–92.
29. Káradóttir R, Cavelier P, Bergersen LH, Attwell D. NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature.* 2005 déc 22;438(7071):1162–6.
30. Kolodziejczyk K, Saab AS, Nave K-A, Attwell D. Why do oligodendrocyte lineage cells express glutamate receptors? *F1000 Biol Rep.* 2010;2:57.
31. Tekkök SB, Goldberg MP. AMPA/Kainate Receptor Activation Mediates Hypoxic Oligodendrocyte Death and Axonal Injury in Cerebral White Matter. *J. Neurosci.* 2001 juin 15;21(12):4237–48.
32. Manning SM, Talos DM, Zhou C, Selip DB, Park H-K, Park C-J, et al. NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia. *J. Neurosci.* 2008 juin 25;28(26):6670–8.
33. Back SA, Gan X, Li Y, Rosenberg PA, Volpe JJ. Maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress-induced death caused by glutathione depletion. *J. Neurosci.* 1998 août 15;18(16):6241–53.
34. Merrill JE, Ignarro LJ, Sherman MP, Melinek J, Lane TE. Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide. *J. Immunol.* 1993 août 15;151(4):2132–41.
35. Takahashi JL, Giuliani F, Power C, Imai Y, Yong VW. Interleukin-1beta promotes oligodendrocyte death through glutamate excitotoxicity. *Ann. Neurol.* 2003 mai;53(5):588–95.
36. Volpe JJ. Cerebral White Matter Injury of the Premature Infant—More Common Than You Think. *Pediatrics.* 2003 janv 7;112(1):176–80.
37. Choi E-K, Park D, Kim TK, Lee SH, Bae D-K, Yang G, et al. Animal models of periventricular leukomalacia. *Lab Anim Res.* 2011 juin;27(2):77–84.
38. Dommergues MA, Patkai J, Renauld JC, Evrard P, Gressens P. Proinflammatory cytokines and interleukin-9 exacerbate excitotoxic lesions of the newborn murine neopallium. *Ann. Neurol.* 2000 janv;47(1):54–63.
39. Young RS, Yagel SK, Towfighi J. Systemic and neuropathologic effects of E. coli endotoxin in neonatal dogs. *Pediatr. Res.* 1983 mai;17(5):349–53.
40. Yoon BH, Romero R, Moon JB, Shim SS, Kim M, Kim G, et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm labor and intact membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2001 nov;185(5):1130–6.
41. Shim S-S, Romero R, Hong J-S, Park C-W, Jun JK, Kim BI, et al. Clinical significance of intra-amniotic inflammation in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2004 oct;191(4):1339–45.
42. Nelson KB, Dambrosia JM, Grether JK, Phillips TM. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann. Neurol.* 1998 sept;44(4):665–75.

43. Eklind S, Mallard C, Leverin AL, Gilland E, Blomgren K, Mattsby-Baltzer I, et al. Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic--ischaemic injury. *Eur. J. Neurosci.* 2001 mars;13(6):1101–6.
44. Sherwin C, Fern R. Acute lipopolysaccharide-mediated injury in neonatal white matter glia: role of TNF-alpha, IL-1beta, and calcium. *J. Immunol.* 2005 juill 1;175(1):155–61.
45. Favrais G, van de Looij Y, Fleiss B, Ramanantsoa N, Bonnin P, Stoltenburg-Didinger G, et al. Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Annals of Neurology.* 2011 oct 1;70(4):550–65.
46. Mitchell JA, Warner TD. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol.* 1999 nov;128(6):1121–32.
47. Carlson NG, Rojas MA, Redd JW, Tang P, Wood B, Hill KE, et al. Cyclooxygenase-2 expression in oligodendrocytes increases sensitivity to excitotoxic death. *J Neuroinflammation.* 2010;7:25.
48. Carty ML, Wixey JA, Reinebrant HE, Gobe G, Colditz PB, Buller KM. Ibuprofen inhibits neuroinflammation and attenuates white matter damage following hypoxia-ischemia in the immature rodent brain. *Brain Res.* 2011 juill 21;1402:9–19.
49. Favrais G, Schwendimann L, Gressens P, Lelièvre V. Cyclooxygenase-2 mediates the sensitizing effects of systemic IL-1-beta on excitotoxic brain lesions in newborn mice. *Neurobiol. Dis.* 2007 mars;25(3):496–505.
50. Bazan NG. COX-2 as a multifunctional neuronal modulator. *Nat. Med.* 2001 avr;7(4):414–5.
51. Cimino PJ, Keene CD, Breyer RM, Montine KS, Montine TJ. Therapeutic targets in prostaglandin E2 signaling for neurologic disease. *Curr. Med. Chem.* 2008;15(19):1863–9.
52. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 1999 oct;79(4):1193–226.
53. Ahmad AS, Zhuang H, Echeverria V, Doré S. Stimulation of prostaglandin EP2 receptors prevents NMDA-induced excitotoxicity. *J. Neurotrauma.* 2006 déc;23(12):1895–903.
54. Jiang J, Ganesh T, Du Y, Thepchatri P, Rojas A, Lewis I, et al. Neuroprotection by selective allosteric potentiators of the EP2 prostaglandin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010 févr 2;107(5):2307–12.
55. Liang X, Lin L, Woodling NS, Wang Q, Anacker C, Pan T, et al. Signaling via the prostaglandin E₂ receptor EP4 exerts neuronal and vascular protection in a mouse model of cerebral ischemia. *J. Clin. Invest.* 2011 nov;121(11):4362–71.
56. Kawano T, Anrather J, Zhou P, Park L, Wang G, Frys KA, et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. *Nat. Med.* 2006 févr;12(2):225–9.

57. Ahmad M, Ahmad AS, Zhuang H, Maruyama T, Narumiya S, Doré S. Stimulation of prostaglandin E2-EP3 receptors exacerbates stroke and excitotoxic injury. *J. Neuroimmunol.* 2007 mars;184(1-2):172–9.
58. Saleem S, Kim YT, Maruyama T, Narumiya S, Doré S. Reduced acute brain injury in PGE2 EP3 receptor-deficient mice after cerebral ischemia. *J. Neuroimmunol.* 2009 mars 31;208(1-2):87–93.
59. McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* 1980 juin;85(3):890–902.
60. Chen Y, Balasubramanian V, Peng J, Hurlock EC, Tallquist M, Li J, et al. Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1044–51.
61. Vourc'h P, Dessay S, Mbarek O, Marouillat Védrine S, Müh J-P, Andres C. The oligodendrocyte-myelin glycoprotein gene is highly expressed during the late stages of myelination in the rat central nervous system. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 2003 sept 10;144(2):159–68.
62. Buser JR, Maire J, Riddle A, Gong X, Nguyen T, Nelson K, et al. Arrested preoligodendrocyte maturation contributes to myelination failure in premature infants. *Annals of Neurology.* 2012 janv 24;71(1):93–109.
63. Nelson KB, Dambrosia JM, Grether JK, Phillips TM. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann. Neurol.* 1998 oct;44(4):665–75.

Résumé

Les atteintes de la substance blanche retrouvées chez les nouveau-nés prématurés sont regroupées sous le terme de Leucomalacie périventriculaire (LPV). Un des facteurs de risque identifiés est l'inflammation périnatale. La prostaglandine E2 (PGE2) a été identifiée comme l'un des médiateurs de l'inflammation et pourrait être un acteur important dans la survenue de LPV. Ces atteintes ont été directement rapportées à un défaut de myélinisation oligodendrocytaire. L'objectif de cette étude est de rechercher si la PGE2 possède un effet direct sur la lignée oligodendrocytaire *in vitro*. Dans un premier temps, nous avons étudié *in vitro* par immunocytochimie et RT-PCR différents stades de maturation oligodendrocytaire grâce à des marqueurs spécifiques sous l'influence ou non de la PGE2. De plus, nous avons évalué l'effet de la PGE2 sur la mortalité oligodendrocytaire par comptage des noyaux pycnotiques dans nos cultures. En parallèle, nous avons étudié par RT-PCR l'expression par l'oligodendrocyte des différents récepteurs EP (1, 2, 3 et 4) à la PGE2 au cours du temps sous l'influence ou non de la PGE2. L'oligodendrocyte en culture exprime les ARNs messagers des 4 récepteurs à la PGE2 dont les expressions sont variables au cours du temps et des stades de maturation oligodendrocytaire. La PGE2 semble induire une diminution de l'expression de son récepteur neuroprotecteur EP4. Parallèlement, la PGE2 entraîne une augmentation des formes jeunes et une diminution des oligodendrocytes immatures et matures, sans augmentation de la mortalité. Ces constatations sont compatibles avec un blocage de la maturation oligodendrocytaire, déjà observé *in vivo* dans des modèles animaux de leucomalacie périventriculaire, et ce sous l'effet direct de la PGE2.

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira
pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

Académie d'Orléans – Tours

Université François-Rabelais

Faculté de Médecine de TOURS

GUERREIRO QUILICHINI Julie

Thèse n°

68 pages – 2 tableaux – 30 figures

Résumé :

Les atteintes de la substance blanche retrouvées chez les nouveau-nés prématurés sont regroupées sous le terme de Leucomalacie périventriculaire (LPV). Un des facteurs de risque identifiés est l'inflammation périnatale. La prostaglandine E2 (PGE2) a été identifiée comme l'un des médiateurs de l'inflammation et pourrait être un acteur important dans la survenue de LPV. Ces atteintes ont été directement rapportées à un défaut de myélinisation oligodendrocytaire. L'objectif de cette étude est de rechercher si la PGE2 possède un effet direct sur la lignée oligodendrocytaire *in vitro*. Dans un premier temps, nous avons étudié *in vitro* par immunocytochimie et RT-PCR différents stades de maturation oligodendrocytaire grâce à des marqueurs spécifiques sous l'influence ou non de la PGE2. De plus, nous avons évalué l'effet de la PGE2 sur la mortalité oligodendrocytaire par comptage des noyaux pycnotiques dans nos cultures. En parallèle, nous avons étudié par RT-PCR l'expression par l'oligodendrocyte des différents récepteurs EP (1, 2, 3 et 4) à la PGE2 au cours du temps sous l'influence ou non de la PGE2. L'oligodendrocyte en culture exprime les ARNs messagers des 4 récepteurs à la PGE2 dont les expressions sont variables au cours du temps et des stades de maturation oligodendrocytaire. La PGE2 semble induire une diminution de l'expression de son récepteur neuroprotecteur EP4. Parallèlement, la PGE2 entraîne une augmentation des formes jeunes et une diminution des oligodendrocytes immatures et matures, sans augmentation de la mortalité. Ces constatations sont compatibles avec un blocage de la maturation oligodendrocytaire, déjà observé *in vivo* dans des modèles animaux de Leucomalacie périventriculaire, et ce sous l'effet direct de la PGE2.

Mots clés :

- Leucomalacie périventriculaire
- Prématurité
- Inflammation
- Myélinisation

Jury :

Président : Monsieur le Professeur Elie SALIBA
Membres : Monsieur le Professeur Christian ANDRES
Monsieur le Professeur Pierre THOMAS-CASTELNAU
Madame le Docteur Géraldine FAVRAIS

Date de la soutenance : Le lundi 14 mai 2012.