



HAL
open science

Influence de la microglie et du BDNF sur l'induction de la neuroplasticité après un accident vasculaire cérébral ischémique

Alexandre Madinier

► **To cite this version:**

Alexandre Madinier. Influence de la microglie et du BDNF sur l'induction de la neuroplasticité après un accident vasculaire cérébral ischémique. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOS037 . tel-00692476

HAL Id: tel-00692476

<https://theses.hal.science/tel-00692476>

Submitted on 30 Apr 2012

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

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

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE
Ecole Doctorale Environnement, Santé, STIC

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Sciences de la Vie

par

Alexandre MADINIER

le

30 septembre 2011

INFLUENCE DE LA MICROGLIE ET DU BDNF SUR
L'INDUCTION DE LA NEUROPLASTICITÉ APRÈS UN
ACCIDENT VASCULAIRE CÉRÉBRAL ISCHEMIQUE

Directeurs de thèse :

Pr. Nathalie BERTRAND

Dr. Philippe GARNIER

JURY

| | |
|-----------------------|------------|
| Pr. Céline DEMOUGEOT | Présidente |
| Dr. Alain BESSIS | Rapporteur |
| Pr. Isabelle MARGAILL | Rapporteur |
| Pr. Nathalie BERTRAND | Examineur |
| Dr. Philippe GARNIER | Examineur |

« La Science efface l'ignorance d'hier et révèle l'ignorance d'aujourd'hui. »

David Gross

Remerciements

A Madame Céline Demougeot, Professeur à la Faculté de Sciences médicales et pharmaceutiques de Besançon qui m'a fait l'honneur de juger ce travail en tant qu'examinateur et de présider ce jury de thèse. Qu'elle trouve ici le témoignage de mes remerciements.

A Monsieur Alain Bessis, Directeur de recherche à l'Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, qui a bien voulu juger ce travail en tant que rapporteur. Qu'il trouve ici le témoignage de mes remerciements.

A Madame Isabelle Margail, Professeur à la Faculté de Sciences pharmaceutiques et biologiques de Paris 5, qui a accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Qu'elle trouve ici le témoignage de mes remerciements.

A Madame Nathalie Bertrand, Professeur à l'IUT de Dijon, et directrice de ce travail de thèse. Pour m'avoir supporté dans toutes les étapes de cette thèse et en particulier pour ses nombreuses et attentives relectures, qu'elle trouve ici l'expression de mes plus vifs remerciements.

A Monsieur Philippe Garnier, Maître de conférences à l'IUT de Dijon, et co-encadrant de ce travail de thèse.

Pour m'avoir assisté dans toutes les étapes et les difficultés de cette thèse. Pour sa disponibilité et son dynamisme, qu'il trouve ici l'expression de mes plus sincères remerciements.

A Monsieur Thierry Pozzo, directeur de l'unité INSERM U887 Motricité-Plasticité à l'Université de Dijon,

Pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, qu'il trouve ici le témoignage de ma gratitude.

A Madame Christine Marie, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Dijon,

Qui a accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse et a suivi avec intérêt l'évolution de ce travail de thèse, qu'elle trouve ici le témoignage de ma gratitude.

A Madame Anne Tessier, Maître de conférences à la Faculté de Pharmacie de Dijon,

Qui a accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse, qu'elle trouve ici le témoignage de ma gratitude.

A Monsieur Claude Mossiat, Ingénieur, à la Faculté de Pharmacie de Dijon,

Pour m'avoir formé aux techniques physiologiques, pour sa rigueur et son sérieux, qu'il soit assuré de ma sincère reconnaissance.

A toutes les personnes du laboratoire que j'ai pu côtoyer au cours de ma thèse, en particulier Alain Beley, Jean-Michel Hlubina, Olivier Perrot, Aurore Quirié, Marion Rodier, Yannick Béjot, Olivier Bousquet, Marie Hervieux, Emmanuelle Ciman et Jacques Kaminski. Pour leurs conseils, leurs assistances et pour les moments passés ensemble, je les remercie.

Finalement, un grand merci à toutes les personnes qui m'ont soutenu au cours de ces années de thèse : mes parents, mes frères et sœurs, mes compagnons d'infortune (Jérémy, Simon, Anne-Laure...), mes amis (Yann, Charles, Mamat, Jennifer, Marion...) et mes colocos (en particulier Laure).

Résumé

L'émergence de la notion selon laquelle la réponse inflammatoire exercerait des effets bénéfiques dans la pathologie ischémique cérébrale, en particulier au cours de la phase de récupération fonctionnelle nous a conduit à étudier l'implication des cellules microgliales dans le déclenchement des mécanismes de neuroplasticité post-ischémique. Notre étude a été réalisée chez le Rat soumis à une ischémie focale permanente induite par photothrombose. L'activation microgliale a été modulée par un traitement au 3-aminobenzamide (3-AB), un inhibiteur spécifique de la poly(ADP-ribose)polymérase-1, jouant un rôle prépondérant dans l'activation de ces cellules. Nos données montrent que le 3-AB entraîne une diminution importante de l'activation microgliale aux temps courts associée à plus long terme à une réduction de l'expression de la synaptophysine et de GAP-43, respectivement marqueurs des processus de synaptogenèse et croissance axonale. L'ensemble de ces données indique donc que les cellules microgliales constituent effectivement des acteurs cellulaires essentiels de la neuroplasticité post-ischémique. Le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) se révélant un candidat potentiellement capable de promouvoir de tels changements, nous avons pu mettre en évidence que ces cellules représentaient de façon précoce une source importante de BDNF. Ces résultats ont été confirmés par une nette diminution des taux de BDNF mesurés dans les zones corticales lésionnelles et péri-lésionnelles des animaux traités par le 3-AB. Dans un deuxième temps, le métabolisme complexe de cette neurotrophine à travers l'existence de deux formes, pro- et mature, aux effets biologiques opposés, nous a conduit à réaliser une étude spatio-temporelle des expressions post-ischémiques du BDNF total (ELISA), pro- et mature (Western blotting). Aux temps courts (4-24 h), les expressions du BDNF total, pro- et mature sont augmentées dans les territoires corticaux lésés, péri-lésionnels et homotopiques tandis qu'aux temps longs (8-30 j), le BDNF total reste accru dans les régions distantes de la zone infarctée (hippocampes et cortex contralatéral). Concernant les expressions des formes pro- et mature, nos résultats indiquent une augmentation entre 8 et 30 j uniquement dans les territoires hippocampiques. D'un point de vue cellulaire, le BDNF est exprimé du côté ipsilatéral dans les neurones et les cellules non neuronales tandis que du côté contralatéral, l'expression est limitée aux neurones. Nos résultats tout en faisant apparaître des divergences importantes dans les variations d'expressions du BDNF total (ELISA) et des différentes formes (Western blotting) indiquent que la mesure du BDNF total doit être couplée à une étude permettant de discriminer les deux formes. De plus, tout en confirmant l'implication de cette neurotrophine dans les mécanismes adaptatifs induits en réponse à une ischémie cérébrale, ces données suggèrent que les territoires distants de la zone lésée jouent un rôle majeur dans ces processus.

Mots clés : AVC expérimental - Microglie - Inflammation - BDNF - Neuroplasticité - Synaptogenèse - Croissance axonale

Abstract

Evidences showing that under certain circumstances, inflammatory response could be neuroprotective and could also promote adult neurogenesis are growing. In this context, the objective of this work was to investigate the impact of microglial cells in the neuroplastic events. Rats were subjected to photothrombotic ischemia and microglial cells activation was blocked by the mean of poly(ADP-ribose)polymérase-1 (PARP-1) inhibition using 3-aminobenzamide (3-AB) since this protein has been shown to play a major role in this activation. Our results show that PARP-1 activity reduction was associated with a strong repression of the acute microglial activation. Beside, 3-AB treated animals exhibited a decrease in synaptophysin (synaptogenesis) and GAP-43 (axonal growth) expressions. Taken together, our data argue for a supportive role of microglial in adaptive brain plasticity events. According to the preponderant contribution of BDNF in these events, assessment of its cellular localization was performed, and confirmed that these cells represent a significant source. Beside, BDNF immunoreactivity (IR) in microglial cells and BDNF levels in the lesioned and surrounding lesioned areas were found decreased in 3-AB treated animals. However, since this neurotrophin can exert ambivalent biological actions through pro- versus mature forms, we investigate the proper effect of cerebral ischemia on total (Elisa), pro- and mature (Western blotting) expressions. Our results show that total, pro- and mature BDNF expressions are augmented in the early times (4-24h) of ischemia within the lesioned, the surrounding non lesioned and the contralateral cortical areas. At longer time points, total BDNF was still increased at 8d in regions distant from the lesion (hippocampi and contralateral cortex) while pro- and mature forms rise between 8d to 30d in hippocampic territories only. In term of cellular distribution, BDNF-IR was found in neurons but also in non neuronal cells ipsilaterally whereas in the opposite side BDNF staining was restricted to neurons. Our data while raising the question of the pertinence of total BDNF expression in a context of studying its supportive potential action indicate that such assessment has to be coupled with the discrimination of both forms. In addition, our data confirm the important role of BDNF in post-stroke adaptive mechanisms and argue in favour of an important contribution of the hippocampal territory and of the contralateral hemisphere in BDNF related post-stroke neuronal circuit remodelling suggesting that strategies targeting this hemisphere are likely to mediate functional compensation.

Key words : Experimental stroke - Microglia - Inflammation - BDNF - Neuroplasticity - Synaptogenesis - Axonal growth

Table des matières

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Table des matières | 7 |
| Liste des abréviations | 10 |
| Liste des figures | 12 |
| Liste des tableaux | 13 |
| Introduction | 15 |
| Première partie : Rappels Bibliographiques | 21 |
| <i>I Physiopathologie de l'accident vasculaire cérébral ischémique</i> | 23 |
| A Le déficit énergétique | 23 |
| B Conséquences du déficit énergétique | 23 |
| 1) Acidose tissulaire..... | 23 |
| 2) Perturbations des flux ioniques et hydriques..... | 25 |
| a/ Altérations de l'homéostasie ionique..... | 25 |
| b/ Œdème cérébral..... | 26 |
| 3) Perturbations du métabolisme des neurotransmetteurs..... | 27 |
| 4) Implication des radicaux libres dans l'ischémie..... | 28 |
| a/ Principales espèces radicalaires produites au cours de l'ischémie..... | 28 |
| b/ Participation des radicaux libres aux dommages cellulaires post-ischémiques..... | 31 |
| 5) La réponse inflammatoire..... | 34 |
| a/ Composante cellulaire de la réponse inflammatoire..... | 35 |
| b/ Composante biochimique de la réponse inflammatoire..... | 39 |
| 6) Mort cellulaire post-ischémique..... | 42 |
| a/ Nécrose..... | 42 |
| b/ Apoptose..... | 43 |
| c/ Autophagie..... | 45 |
| C Pénombre ischémique | 46 |
| 1) Notion de débit sanguin..... | 46 |
| 2) Cœur et pénombre ischémique..... | 47 |
| <i>II La poly(ADP-Ribose) polymérase 1</i> | 50 |
| A Structure et activité | 50 |
| B Rôles physiologiques de PARP-1 | 53 |
| 1) Implication dans la réparation des lésions de l'ADN..... | 53 |
| 2) Rôle dans le cycle cellulaire..... | 54 |
| 3) PARP-1 et régulation de l'expression génique..... | 54 |
| C Rôle de PARP-1 dans la mort cellulaire d'origine ischémique | 55 |
| D Rôle de PARP-1 dans le déclenchement de la réponse inflammatoire | 58 |
| <i>III Microglie</i> | 60 |
| A Introduction | 60 |
| B Les origines de la microglie | 61 |
| 1) Formation des cellules microgliales au cours du développement..... | 61 |
| 2) Renouvellement hématopoïétique des cellules microgliales..... | 62 |
| C Hétérogénéité de la microglie | 64 |
| 1) La microglie au cours du développement du SNC..... | 64 |
| 2) La microglie dans le SNC adulte sain..... | 65 |
| 3) La microglie dans le SNC sénescant..... | 66 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|------------|
| D Activation de la microglie | 66 |
| 1) Les voies d'activation | 67 |
| 2) Plasticité fonctionnelle de la microglie..... | 68 |
| 3) Activation en réponse à une ischémie cérébrale | 70 |
| a/ Cinétique d'activation..... | 70 |
| b/ Rôle délétère et rôle bénéfique des cellules microgliales..... | 71 |
| E Distinction entre microglie et macrophages | 73 |
| IV La Neuroplasticité | 74 |
| A Historique | 74 |
| B La croissance axonale | 75 |
| 1) Cônes de croissance axonale..... | 76 |
| 2) Facteurs contrôlant la croissance axonale..... | 77 |
| 3) Mécanismes de régulation de la croissance axonale..... | 79 |
| C Synaptogenèse | 79 |
| D Neurogenèse | 83 |
| E Neuroplasticité en réponse à un AVC ischémique | 85 |
| 1) Récupération fonctionnelle | 85 |
| 2) Croissance axonale..... | 86 |
| 3) Synaptogenèse..... | 87 |
| 4) Neurogenèse..... | 87 |
| 5) Facteurs synthétisés | 88 |
| 6) Angiogenèse..... | 89 |
| Deuxième partie : Matériels et Méthodes | 91 |
| I Techniques physiologiques | 93 |
| A Animaux | 93 |
| B Modèle d'ischémie focale permanente par photothrombose | 93 |
| 1) Principe | 93 |
| 2) Réalisation de l'ischémie | 93 |
| C Traitement des animaux au 3 aminobenzamide (3-AB) | 94 |
| D Rinçage des cerveaux par voie transcardiaque | 95 |
| E Prélèvement des tissus cérébraux | 95 |
| II Techniques biochimiques | 96 |
| A Extraction des protéines | 96 |
| B Dosage des protéines | 96 |
| 1) Principe | 96 |
| 2) Protocole | 97 |
| C Technique de Western Blotting | 97 |
| 1) Principe | 97 |
| 2) Electrophorèse..... | 97 |
| a/ Préparation des gels..... | 98 |
| b/ Préparation des échantillons à déposer | 98 |
| c/ Migration | 98 |
| d/ Transfert | 99 |
| e/ Immunoblotting / Révélation..... | 99 |
| 3) Analyse | 100 |
| D Méthode immuno-enzymatique ELISA | 101 |
| 1) Principe | 101 |
| 2) Protocole | 102 |
| III Techniques histologiques | 103 |
| A Fixation et coupes des cerveaux | 103 |
| B Détermination du volume de l'infarctus | 103 |
| 1) Coloration des coupes au crésyl violet..... | 103 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2) Calcul du volume de la lésion..... | 104 |
| C Double coloration à la fuchsine acide et au bleu de Toluidine..... | 104 |
| 1) Principe..... | 104 |
| 2) Protocole..... | 104 |
| D Immunohistofluorescence..... | 105 |
| 1) Principe..... | 105 |
| 2) Protocole..... | 105 |
| <i>IV Analyses statistiques des résultats.....</i> | <i>106</i> |
| Troisième partie : Résultats et Discussion..... | 107 |
| <i>I Première étude : Implication de la microglie dans les changements neuroplastiques accompagnant une ischémie focale chez le Rat.....</i> | <i>109</i> |
| A Résumé..... | 109 |
| 1) Objectif de l'étude..... | 109 |
| 2) Principaux résultats..... | 109 |
| B Publication..... | 110 |
| 1) Abstract..... | 111 |
| 2) Introduction..... | 111 |
| 3) Materials and methods..... | 112 |
| 4) Results..... | 114 |
| 5) Discussion..... | 117 |
| 6) References..... | 121 |
| C Résultats complémentaires..... | 123 |
| <i>II Seconde étude : Etude de l'expression du BDNF total, du BDNF mature et du pro-BDNF dans l'hémisphère ipsilatéral et contralatéral accompagnant une ischémie.....</i> | <i>125</i> |
| A Résumé..... | 125 |
| 1) Objectif de l'étude..... | 125 |
| 2) Principaux résultats..... | 125 |
| B Publication..... | 126 |
| 1) Abstract..... | 127 |
| 2) Introduction..... | 128 |
| 3) Materials and methods..... | 128 |
| 4) Results..... | 130 |
| 5) Discussion..... | 135 |
| 6) References..... | 137 |
| Résumé, conclusion et perspectives..... | 141 |
| Bibliographie..... | 149 |

Liste des abréviations

| | |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 3-AB : 3-aminobenzamide | E-sélectine : Sélectine endothéliale |
| ACM : Artère cérébrale moyenne | FGF : “Fibroblast growth factor” |
| ADN : Acide désoxyribonucléique | GABA : Acide γ -aminobutyrique |
| ADP : Adénosine diphosphate | GAP-43 : “Growth associated protein 43” |
| AIF : “Apoptosis inducing factor” | GDNF : “Glial cell line derived neurotrophic factor” |
| AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate | GFAP : “Glial fibrillary acidic protein” |
| AP-1 et 2 : “Activator protein” | GFP : “Green fluorescent protein” |
| ATP : Adénosine triphosphate | GM-CSF : “Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor” |
| AVC : Accident vasculaire cérébral | GSK : “Glycogen synthase kinase” |
| BCA : Acide bicinchoninique | GTP : Guanine triphosphate |
| Bcl : “B cell lymphoma” | HIF-1 α : “Hypoxia inducing factor 1 α ” |
| BDNF : “Brain derived neurotrophic factor” | HRP: “Horseradish peroxidase” |
| BER : “Base excision repair” | HSP : “Heat shock protein” |
| BHE : Barrière hémato-encéphalique | ICAM : Molécule d’adhésion cellulaire intercellulaire |
| BMDM: “Bone marrow derived microglia” | IFN- γ : Interféron γ |
| BSA : “Bovin serum albumin” | IGF-1 : “Insulin growth factor 1” |
| CA1 : Corne d’Ammon | IL : Interleukine |
| CAM : Molécules d’adhésion cellulaire | iNOS : NO synthase inductible |
| Caspase : “Cysteine-aspartate protease” | I κ B : “Inhibitor of kappa B” |
| CD : Cluster de différenciation | KARAP/DAP12 : “KAR associated protein/DNAX activator protein 12” |
| Cdk 5 : “Cyclin-dependent kinase 5” | KO : “Knock out” |
| CMH : Complexe majeur d’histocompatibilité | LPS : Lipopolysaccharide |
| CNTF : “Ciliary neurotrophic factor” | Mac1 : “Macrophage 1 antigen” |
| COX : Cyclooxygénase | MAG : “Myelin associated glycoprotein” |
| CRMP : “Collapsin response mediator protein” | MAPK : “Mitogen-activated protein kinase” |
| DMSO : Diméthylsulfoxyde | MCP-1 : “Monocyte chemotatic protein 1” |
| ECL+ : “Enhanced chimiluminescence plus” | M-CSF : “Macrophage colony-stimulating factor” |
| EGF : “Epidermal growth factor” | MEC : Matrice extracellulaire |
| ELISA : “Enzyme linked immunosorbent assay” | MIP : “Macrophage inflammatory protein” |
| eNOS : NO synthase endothéliale | |
| EPC : “Endothelial progenitor cell” | |
| EPO : Erythropoïétine | |
| ERK : “Extracellular signal-regulated kinase” | |

MMP : Métalloprotéinase matricielle
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B : “Nuclear factor kappa B ”
NGF : “Nerve growth factor”
NMDA : Acide N-méthyl-D-aspartique
nNOS : NO synthase neuronale
NOS : NO synthase
NT : Neurotrophine
P1 et 2 : Punch 1 et 2
PAR : Polymère d’ADP-ribose
PARP : Poly(ADP-ribose) Polymérase
pb : paire de base
PBS : "Phosphate buffer saline"
PCr : Phosphocréatine
PFA : Paraformaldéhyde
PKC : Protéine kinase C
PLA2 : Phospholipase A2
P-sélectine : Sélectine plaquettaire
PVDF : Polyvinylidènefluoride
RI : Réponse inflammatoire
RL : Radicaux libres
rtPA : “recombinant tissue plasminogene activator”
SAP : “Synapse associated protein”
SDS: Dodécyl sulfate de sodium
SGZ : zone sous-granulaire
SNC : Système nerveux central
SOD : Superoxyde dismutase
SVZ : zone sous-ventriculaire
SynCAM : “Synaptic cell adhesion molecule”
TBS : “Tris buffered saline”
TBS-T: “TBS-Tween 20”
TGF- β : “Transforming growth factor β ”
TH : “Lymphocyte T helper”
TLR : “Toll like receptor”
TNF- α : “Tumor necrosis factor α ”
VEGF : “Vascular endothelial growth factor”
Wnt : “Wingless related mouse mammary tumor virus integration site family”
XRCC1 : “X-ray cross complementing factor 1”

Liste des figures

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1 : Conséquences de l'acidose post-ischémique. | 25 |
| Figure 2 : Production de radicaux libres suite à une ischémie. | 34 |
| Figure 3 : Principales étapes du recrutement des leucocytes..... | 37 |
| Figure 4 : Conséquences de la réponse inflammatoire suite à une ischémie cérébrale. | 42 |
| Figure 5 : Schéma simplifié des différentes voies de l'apoptose..... | 44 |
| Figure 6 : Différentes formes d'autophagies. | 46 |
| Figure 7 : Evolution de la mort cellulaire et de la pénombre ischémique au cours du temps. | 48 |
| Figure 8 : Cascade biochimique post-ischémique. | 49 |
| Figure 9 : Réaction catalysée par les PARPs : formation de polymères d'ADP-ribose à partir de NAD ⁺ | 50 |
| Figure 10 : Structure de la protéine PARP-1..... | 52 |
| Figure 11 : Production d'énergie au niveau de la cellule et effet de la suractivation de PARP-1 sur les stocks énergétiques..... | 56 |
| Figure 12 : Conséquences de l'activation de PARP-1 en fonction de l'intensité des dommages de l'ADN..... | 58 |
| Figure 13 : Différentes origines de la microglie..... | 63 |
| Figure 14 : Principales voies de déclenchement de la réponse inflammatoire microgliale..... | 68 |
| Figure 15 : Activation des cellules microgliales. | 69 |
| Figure 16 : Dualité de l'activité microgliale post ischémique..... | 73 |
| Figure 17 : Cône de croissance axonale. | 76 |
| Figure 18 : Fonctionnement d'une synapse glutamatergique. | 81 |
| Figure 19 : Principe de l'ischémie focale permanente par photothrombose. | 94 |
| Figure 20 : Structure du 3-AB..... | 95 |
| Figure 21 : Principales étapes du Western blotting. | 101 |
| Figure 22 : Principales étapes du dosage du BDNF par ELISA..... | 102 |
| Figure I-1 : Cortical tissue sampling and dimensions of ischemic lesion..... | 112 |
| Figure I-2 : Temporal evolution of infarct volume : effect of 3-AB treatment..... | 113 |
| Figure I-3 : Effect of 3-AB treatment on PARP-1 activation and PAR/NeuN , PAR/OX-42 immunocolocalization. | 115 |
| Figure I-4 : Time course of microglial/macrophages activation after ischemia : effect of 3-AB treatment..... | 116 |
| Figure I-5 : Time course of microglial/macrophages phagocytic activity after ischemia : effect of 3-AB treatment. | 118 |
| Figure I-6 : Time course of GAP-43 expression after ischemia : effect of 3-AB treatment. | 119 |
| Figure I-7 : Time course of synaptophysin expression after ischemia : effect of 3-AB treatment. ... | 119 |
| Figure I-8 : Time course of BDNF production after ischemia and BDNF/OX-42, BDNF/NeuN immunocolocalization : effect of 3-AB treatment..... | 120 |
| Figure 23 : Différentes formes de mort neuronale et différents stades de mort apoptotique | 123 |
| Figure II-1 : Time course of BDNF production in response to photothrombotic cortical ischemia in different ipsilateral cerebral areas. | 131 |
| Figure II-2 : Time course of BDNF production in response to photothrombotic cortical ischemia in different contralateral cerebral areas. | 132 |
| Figure II-3 : Immunolocalization of BDNF in neurons following photothrombotic cortical ischemia. | 133 |
| Figure II-4 : Immunolocalization of BDNF in microglia following photothrombotic cortical ischemia. | 134 |
| Figure II-5 : Immunolocalization of BDNF in astrocytes following photothrombotic cortical ischemia. | 134 |

Liste des tableaux

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tableau 1 : Conditions expérimentales utilisées pour la technique de Western blotting..... | 100 |
| Tableau 2 : Coloration des coupes cérébrales au crésyl violet..... | 104 |
| Tableau 3 : Double coloration des coupes à la fuchsine acide et au bleu de Toluidine. | 105 |
| Tableau 4 : Conditions expérimentales utilisées pour l'immunohistofluorescence. | 106 |
| Tableau I-1 : Number of OX-42 positive cells. | 117 |
| Tableau II-1 : Semi-quantification of cellular BDNF expression..... | 135 |

Introduction

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) représentent la troisième cause de mortalité après les maladies coronariennes et les cancers et la première cause de handicap chez l'adulte. A ce titre, ils constituent un problème de santé publique majeur dans les pays industrialisés. Dans près de 80 % des cas, ils sont consécutifs à l'occlusion d'une artère intracérébrale à l'origine d'une ischémie du territoire normalement perfusé par le vaisseau. L'ischémie se définit donc comme une chute de l'apport sanguin au cerveau qui ne reçoit plus le glucose et l'oxygène nécessaires au fonctionnement cellulaire. Il en résulte la formation d'un infarctus cérébral dont la taille et/ou la localisation conditionnent la nature et la sévérité du handicap neurologique des patients victimes d'un AVC ischémique (Emmerich, 1998).

L'espoir de réduire ce handicap a longtemps reposé sur la recherche de moyens d'action thérapeutique à visée neuroprotectrice, à l'aide de molécules capables d'enrayer les mécanismes cytotoxiques induits par l'ischémie et responsables de la mort neuronale. Cependant, les molécules sélectionnées chez l'animal sur des critères histologiques (diminution du volume de l'infarctus dans la phase aiguë de l'AVC) se sont révélées très décevantes chez l'homme, chez qui le critère d'efficacité est la réduction du déficit fonctionnel après 3 ou 6 mois. La complexité des mécanismes physiopathologiques de l'ischémie cérébrale, l'étroitesse de la fenêtre thérapeutique durant laquelle un traitement neuroprotecteur est susceptible d'être efficace et enfin, les critères d'efficacité différents entre les études chez l'animal et les études cliniques expliquent l'échec de la stratégie neuroprotectrice (Bordet *et al.*, 2009).

A ce jour, il n'existe qu'une seule spécialité pharmaceutique mise sur le marché et indiquée dans l'AVC ischémique. Il s'agit d'une forme recombinante de l'activateur tissulaire du plasminogène (r-tPA), un fibrinolytique utilisé pour recanaliser dès que possible les vaisseaux cérébraux occlus et initier une recirculation sanguine du territoire ischémié. Cependant, en raison là encore d'une fenêtre thérapeutique étroite (4,5 h) et d'un risque hémorragique élevé, moins de 2 % des patients peuvent bénéficier de la thrombolyse (Mahagne, 2008).

Face à l'échec des stratégies neuroprotectrices, la communauté scientifique a alors réorienté ses recherches vers de nouvelles stratégies thérapeutiques parmi lesquelles celle visant à promouvoir la neuroplasticité. Cette dernière se définit comme la capacité naturelle du cerveau à compenser la perte de fonction induite par une lésion. En effet, il est maintenant

bien établi que la régression spontanée du déficit fonctionnel de la majorité des patients est en phase subchronique et chronique le reflet de changements neuroplastiques (Wittenber *et al.*, 2003 ; Saucier *et al.*, 2010). Ainsi, cette nouvelle stratégie a pour objectif non plus de réduire la taille de l'infarctus cérébral mais d'identifier des promoteurs cellulaires et moléculaires de la neuroplasticité. Cette identification permettra alors d'élaborer des molécules qui en ciblant ces promoteurs seront potentiellement capables de réduire le déficit fonctionnel des patients victimes d'un AVC.

Par ailleurs, une lésion cérébrale d'origine ischémique induit une réponse inflammatoire (RI) locale qui a été largement impliquée dans la mort neuronale et l'extension de l'infarctus (Wang *et al.*, 2007). Cette contribution de la RI à la maturation de l'infarctus en phase aiguë est la raison pour laquelle son implication dans l'induction de la neuroplasticité en phase subchronique et chronique n'ait été envisagée que plus récemment. Sur le plan cellulaire, l'inflammation post-ischémique se caractérise par l'infiltration de l'infarctus par les globules blancs circulants (neutrophiles, monocytes puis lymphocytes par ordre d'apparition dans le cerveau) et par l'activation/prolifération des cellules microgliales et astrocytaires. Sur le plan biochimique, elle est concomitante de la synthèse et la sécrétion de nombreux composés cytotoxiques et neurotrophiques produits par tous les types cellulaires du système nerveux central (SNC) (Lakhan *et al.*, 2009 ; Jin *et al.*, 2010). Cependant, la principale source de ces différents composés est la microglie activée. Même si les différents stades d'activation de la microglie au cours de l'ischémie ont été bien caractérisés, sa participation dans les processus neuroplastiques via la production de neurotrophines, bien que de plus en plus fréquemment proposée dans la littérature, n'avait pas été décrite.

Dans un premier temps, l'objectif de notre travail a donc été de rechercher l'existence d'un lien entre l'activation microgliale et la mise en place de changements neuroplastiques post-ischémiques. Dans ce but, nous avons étudié les effets d'une réduction de la réponse microgliale induite par une ischémie focale par photothrombose chez le rat sur l'expression de marqueurs de la neuroplasticité. Nous nous sommes plus précisément intéressés à l'expression de la synaptophysine présente dans les vésicules synaptiques et à ce titre, utilisée comme marqueur de la synaptogenèse et de GAP-43 ("growth associated protein"), marqueur de la pousse axonale en raison de sa présence dans les cônes de croissance. La modulation de l'activation microgliale a été obtenue en inhibant la poly(ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1), enzyme dont le rôle dans la RI avait été récemment proposé via l'activation du facteur de

transcription NF- κ B connu pour réguler l'expression de gènes proinflammatoires impliqués dans l'activation/prolifération microgliale.

Dans un deuxième temps, dans le but de proposer une molécule candidate responsable de ces changements neuroplastiques post-ischémiques, nous nous sommes intéressés à l'expression d'une neurotrophine, le "brain-derived neurotrophic factor" (BDNF) dont l'implication dans les processus neuroplastiques était largement discutée. Notre étude a initialement consisté en la mesure du BDNF total par ELISA et Western blotting en réponse à l'ischémie. Puis, la mise sur le marché de nouveaux anticorps plus spécifiquement dirigés vers la forme mature du BDNF nous a permis d'envisager de différencier l'expression des différentes formes de BDNF. Enfin, les différents types cellulaires du SNC étant capables de synthétiser le BDNF, nous avons réalisé une cinétique d'expression du BDNF par immunohistofluorescence en la couplant à une immunolocalisation cellulaire à la fois dans et à proximité de l'infarctus et dans des régions éloignées de la lésion (hippocampe et cortex contralatéral à la lésion).

L'exposé de nos résultats est précédé d'un rappel bibliographique et la description des matériels et méthodes utilisés. Nos résultats présentés sous la forme de publications font ensuite l'objet d'une discussion générale.

Première partie :
Rappels Bibliographiques

I Physiopathologie de l'accident vasculaire cérébral ischémique

A Le déficit énergétique

Le cerveau consomme près de 20 % de l'énergie de l'organisme bien qu'il ne représente que 2 % de la masse du corps humain (Kristian, 2004). Cette forte consommation d'énergie rend le cerveau extrêmement sensible aux variations de l'approvisionnement énergétique.

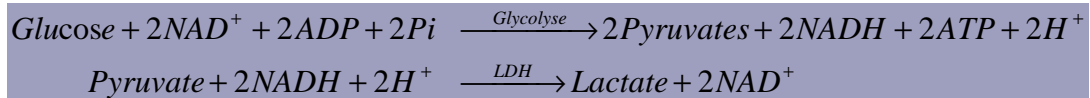
La diminution du débit sanguin au cours de l'AVC s'accompagne d'une réduction de l'apport en oxygène et en glucose. L'oxygène étant l'accepteur final des électrons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale, la diminution de sa concentration ne permet plus une production suffisante d'adénosine triphosphate (ATP). Le déficit énergétique qui s'ensuit constitue l'élément déclencheur à l'origine de multiples réactions cellulaires qui vont conduire à la mort des cellules cérébrales (Lipton, 1999). Cependant, le cerveau est capable de mettre en jeu des processus de compensation qui varient en fonction du degré de l'ischémie.

Lorsque la réduction du débit est modérée, l'augmentation de l'extraction de l'oxygène suffit à maintenir la production d'énergie. Pour des réductions plus sévères, où l'extraction n'est plus suffisante, le cerveau va puiser dans les stocks énergétiques préformés (phosphocréatine (PCr), ATP, adénosine diphosphate (ADP), puis les réserves de glucose et de glycogène). Cependant, ces stocks chutent très rapidement. En effet, il a été rapporté chez la souris soumise à une ischémie complète par décapitation, un épuisement de l'ATP et de la PCr en moins d'une minute (Lowry *et al.*, 1964). Parallèlement, la réduction de l'apport en O₂ s'accompagne d'une activation de la glycolyse anaérobie qui, en tentant de maintenir les stocks énergétiques, va générer du lactate. Cependant, ce processus présente un faible rendement énergétique (2 ATP seulement produit par molécule de glucose contre 36 en condition aérobie).

B Conséquences du déficit énergétique

1) Acidose tissulaire

La glycolyse anaérobie mise en place en réponse à la diminution de l'apport en oxygène s'accompagne d'une accumulation de lactates et de protons dans le tissu cérébral selon les réactions suivantes :



Des études ont ainsi montré que le taux de lactate pouvait être multiplié par 20 suite à une ischémie focale transitoire obtenue par occlusion pendant une heure de l'artère cérébrale moyenne (ACM) chez la Souris (Hata *et al.*, 2000). Cette production de lactate s'accompagne d'une accumulation de protons à l'origine d'une diminution du pH dans les territoires ischémiés. Des mesures réalisées par Kintner *et al.* (2000) ont montré que les pH intracellulaire et extracellulaire d'une valeur initiale respective de 7,1 et 7,25, chutaient à 6,4 en quelques minutes seulement chez des rats soumis à une ischémie complète par arrêt cardiaque. La glycolyse anaérobie n'est cependant pas le seul mécanisme responsable de l'accumulation de protons. En effet, l'acidose post-ischémique est également renforcée par la production d'ions H^+ lors de l'hydrolyse de l'ATP selon la réaction suivante :

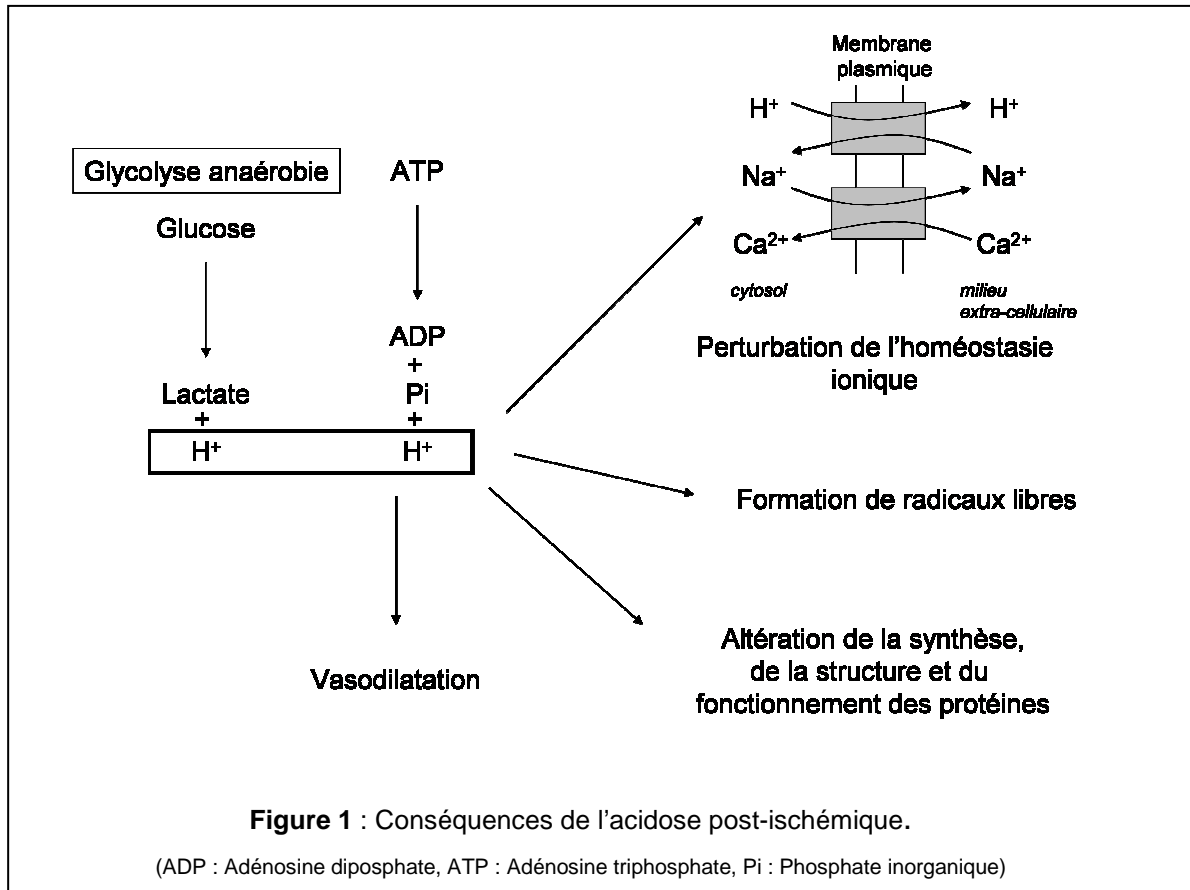


L'acidose dans les tissus lésés est à l'origine de nombreuses perturbations (figure 1) :

- la formation accrue de radicaux libres (RL) à l'origine d'un stress oxydant (voir I.B.4),
- l'entrée de Ca^{2+} dans la cellule qui conduit indirectement à la mort cellulaire (Hertz, 2008),
- l'altération de la synthèse ou de la structure de certaines protéines sensibles au pH (Petsko & Ringe, 2008),
- l'altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (Kristian, 2004),
- une vasodilatation paralytique susceptible d'augmenter la pression intracrânienne en augmentant la masse sanguine du cerveau (Celotto *et al.*, 2008),
- la perturbation du fonctionnement de nombreux transporteurs et des systèmes enzymatiques dont l'activité est pH-dépendante (Frelin *et al.*, 1988 ; Schlue *et al.*, 1992). Par exemple, l'augmentation de l'activité du transporteur Na^+/H^+ , consécutive à la diminution du pH, conduit à l'expulsion des protons hors de la cellule en échange de

sodium. Le Na^+ est à son tour extrudé en échange de Ca^{2+} qui va s'accumuler au sein de la cellule (Yao & Haddad, 2004).

Le déficit énergétique induit par l'ischémie entraîne également des perturbations de tous les métabolismes ATP-dépendants.



2) Perturbations des flux ioniques et hydriques

a/ Altérations de l'homéostasie ionique

Les concentrations ioniques extracellulaires et intracellulaires définissent un gradient transmembranaire qui dépend étroitement du fonctionnement de la Na^+ , K^+ -ATPase. Lors de l'ischémie cérébrale, la déplétion en ATP compromet l'activité de cette enzyme et conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire en Na^+ et à une libération accrue de K^+ . Il en résulte une perte de l'homéostasie ionique à l'origine de la dépolarisation membranaire et du développement d'un œdème cérébral (Siesjö, 1981). En effet, l'augmentation cytosolique en Na^+ crée un appel d'eau du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire entraînant un gonflement cellulaire qui affecte aussi bien les neurones que les cellules gliales et conduit à la lyse cellulaire (Klatzo, 1985).

Parallèlement, on assiste à une accumulation cytosolique de Ca^{2+} provoquée par une entrée massive de Ca^{2+} extracellulaire et par la libération du Ca^{2+} principalement séquestré dans le réticulum endoplasmique. Plusieurs mécanismes expliquent l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique (Siesjö, 1992). Tout d'abord, la diminution des stocks d'ATP conduit à un dysfonctionnement des pompes calciques (membranaires, mitochondriales ou situées au niveau du réticulum endoplasmique) chargées de réguler la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . D'autre part, la perte de potentiel membranaire entraîne une ouverture des canaux calciques voltage-dépendants. De même, l'activation des échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ qui tentent d'extruder le Na^+ et l'ouverture du canal ionique des récepteurs NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate) et kaïnate participent à l'accumulation intracellulaire de Ca^{2+} (Szydłowska & Tymianski, 2010).

L'augmentation de la concentration en Ca^{2+} , qui peut atteindre rapidement un facteur 4 (Yao *et al.*, 2004), participe au découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale et conduit à l'activation d'un certain nombre d'enzymes susceptibles de participer à la mort neuronale. Ce sont notamment des protéases, telles que la calpaïne qui va hydrolyser les protéines du cytosquelette et altérer les systèmes d'initiation de la synthèse protéique, les phospholipases A_2 (PLA_2) qui induisent l'hydrolyse des phospholipides membranaires, mais également d'autres enzymes telles que les endonucléases, les protéines kinases et certaines NO synthases (NOS) (White *et al.*, 2000 ; Arundine & Tymianski, 2003).

b/ Œdème cérébral

La perturbation des flux ioniques s'accompagne d'une perturbation des flux hydriques dans le parenchyme cérébral. L'augmentation de la concentration cytosolique de Na^+ entraîne l'entrée d'ions Cl^- créant un appel d'eau du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Il en résulte un gonflement de la cellule qui conduit à la lyse cellulaire (Kahle *et al.*, 2009). A cet œdème cytotoxique se superpose un œdème ionique suivi d'un œdème vasogénique qui sont à l'origine d'une augmentation du volume net du cerveau.

L'œdème ionique correspond à la phase précoce du dysfonctionnement endothélial. Ainsi, dans les cellules endothéliales, l'appauvrissement en ions et en eau du milieu extracellulaire consécutif à l'œdème cytotoxique (Simard *et al.*, 2007) est à l'origine de flux ioniques et hydriques entre le compartiment vasculaire et le milieu extracellulaire (Young *et al.*, 1987). Parmi les transporteurs impliqués dans ces flux ioniques endothéliaux, le cotransporteur Na-K-Cl (NKCC1) semble jouer un rôle prépondérant. En effet, ce transporteur de Cl^- est synthétisé en réponse à une ischémie et son inhibition s'accompagne

d'une diminution de 50 % de la taille de l'œdème et du volume de lésion (Simard *et al.*, 2006b).

Finalement, l'ischémie cérébrale va conduire à l'œdème vasogénique. Il est induit par la dégradation des jonctions serrées des cellules endothéliales par des protéases, ce qui engendre une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette rupture s'accompagne alors de l'entrée de protéines plasmatiques et d'une accumulation d'eau dans le milieu extracellulaire (Kahle *et al.*, 2009). Il en résulte une augmentation de la pression intracrânienne qui a deux conséquences majeures :

- par la compression mécanique des vaisseaux, elle peut réduire la perfusion sanguine dans les territoires ischémiés et être à l'origine de l'extension de la souffrance tissulaire,
- elle peut provoquer le déplacement de la masse cérébrale et être à l'origine du phénomène d'engagement.

3) Perturbations du métabolisme des neurotransmetteurs

Suite au déficit énergétique et à l'altération de l'homéostasie ionique, les neurones et les cellules gliales vont perdre leur potentiel membranaire (Katsura *et al.*, 1994). Cette dépolarisation, dans le cas des neurones, s'accompagne du relargage de nombreux neuromédiateurs, en particulier du glutamate.

La libération du glutamate au niveau des synapses participe à la mort neuronale selon un concept appelé "excitotoxicité" mis en évidence pour la première fois par Lucas et Newhouse dans les années 50. En effet, ces auteurs ont constaté que l'injection de L-glutamate dans la rétine de souris conduisait à la destruction des neurones des couches internes. Les mécanismes mis en jeu sont les suivants : une fois relargué, le glutamate se fixe sur ses récepteurs ionotropiques post-synaptiques (NMDA, AMPA et kaïnate) augmentant la perméabilité de ces récepteurs canaux aux ions Cl^- , Na^+ et Ca^{2+} . L'entrée d'ions au sein de la cellule s'accompagne d'une entrée d'eau, entraînant une lyse ou un œdème cellulaire (Dirnagl *et al.*, 1999 ; Mergenthaler *et al.*, 2004). De plus, comme nous l'avons évoqué précédemment, l'entrée de calcium initie, via une cascade d'activations enzymatiques, de nombreux mécanismes cytotoxiques pouvant conduire à la mort cellulaire.

Le glutamate n'est cependant pas le seul neuromédiateur libéré au cours de l'ischémie. En effet, la dopamine est également relarguée et exerce des effets délétères, probablement par une génération de RL induite soit par oxydation de son groupement amine par une monoamine oxydase, soit par oxydation spontanée ou enzymatique de son groupement

catéchol (Maker *et al.*, 1981 ; Hasting, 1995 ; Hyslop *et al.*, 1995). La noradrénaline et le GABA (acide γ -aminobutyrique) sont aussi libérés au cours de l'ischémie et participent à la mort cellulaire (Perego *et al.*, 1992 ; Schwartz-Bloom & Sah, 2001). A l'opposé, certains neuromédiateurs tels que la sérotonine et l'histamine présenteraient des propriétés neuroprotectrices (Nakata *et al.*, 1992). Ainsi, l'utilisation d'un traitement à la (S) α -fluorométhylhistidine, un inhibiteur de la synthèse de l'histidine, s'accompagne d'une aggravation de la lésion induite par une ischémie globale transitoire chez la Gerbille (Sugimoto *et al.*, 1994).

4) Implication des radicaux libres dans l'ischémie

Les RL sont des molécules dont une orbitale contient un ou plusieurs électrons non appariés. La présence de ces électrons célibataires leur confère une grande instabilité et une durée de vie très courte en raison de leur forte réactivité. Les RL ont ainsi la capacité de céder leur(s) électron(s), d'arracher un électron ou de s'associer à une autre molécule (Karp *et al.*, 2004).

De nombreux travaux ont montré que l'ischémie est associée à une production accrue de RL (Siesjo *et al.*, 1995 ; Lipton, 1999 ; Chan, 2001 ; Margail *et al.*, 2005) à l'origine d'un stress oxydant participant à la mort cellulaire.

a/ Principales espèces radicalaires produites au cours de l'ischémie

- Les anions superoxydes

Les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) ont pour origine principale la chaîne respiratoire mitochondriale. En effet, il a été montré qu'en raison de la diminution de l'apport en O_2 , l'augmentation de la réduction monovalente de l' O_2 favorise la production de $O_2^{\cdot-}$ (Cadenas & Davies, 2000).

La xanthine oxydase est une autre source d'anions superoxydes. Elle catalyse leur formation en présence d'hypoxanthine et de xanthine. Dans des conditions physiologiques, l'hypoxanthine est métabolisée par la xanthine déshydrogénase pour aboutir à la formation de xanthine, puis d'acide urique. Après une ischémie cérébrale, l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} conduit à la conversion rapide de la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase et l'accumulation d'hypoxanthine provenant de l'hydrolyse de l'ATP (Hagberg *et al.*, 1987) favorise la production d' $O_2^{\cdot-}$ à la reprise de la circulation sanguine. Ainsi, une ischémie globale de 15 min chez le Rat entraîne une augmentation d'un facteur 5 de l'activité de la xanthine oxydase 30 min après induction de l'ischémie (Kinuta *et al.*, 1989). De même, un

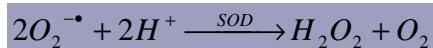
traitement à l'allopurinol, un inhibiteur de la xanthine oxydase, 2 h avant l'induction d'une ischémie focale transitoire s'accompagne d'une diminution significative du volume de la lésion (Isik *et al.*, 2005).

Une troisième voie de production d'anions superoxydes passe par l'activation des enzymes du métabolisme de l'acide arachidonique. En effet, l'hydrolyse des phospholipides par la phospholipase A₂ conduit à l'accumulation d'acide arachidonique dont le métabolisme par les cyclooxygénases (COX) et les lipooxygénases (LOX) engendre la formation d'anions superoxydes et de radicaux hydroxyles (OH[•]) (Katsuki & Okuda, 1995). Diverses études ont notamment montré que la COX 2 est l'une des enzymes participant à la production de RL en réponse à une ischémie focale (Planas *et al.*, 1995 ; Nogawa *et al.*, 1997).

Une dernière source prépondérante d'anions superoxydes est liée à l'activation des NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) oxydases. Originellement découvertes dans les neutrophiles, les NADPH oxydases ont été identifiées dans d'autres types cellulaires incluant les neurones (pour revue Bedard & Krause, 2007). Ces enzymes cytosoliques activées par le Ca²⁺ transfèrent les électrons du NADPH vers l'oxygène moléculaire générant ainsi des anions superoxydes. Dans les neurones, des résultats récents mettent en évidence que ces enzymes constitueraient la source principale d'O₂^{-•} en réponse à l'activation des récepteurs NMDA (Brennan *et al.*, 2009).

- Les radicaux hydroxyles

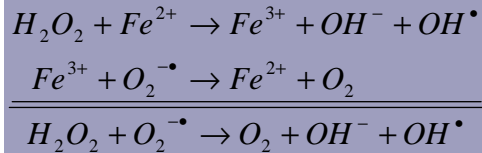
L'anion superoxyde a pendant longtemps été considéré comme un facteur oxydant très réactif mais cette réactivité ne se manifeste que dans un milieu sans protons (Halliwell, 1981). En effet, la présence d'ions H⁺ provoque sa dismutation spontanée en peroxyde d'hydrogène et en oxygène moléculaire. De plus, certaines oxydases (monoamine oxydases) et les superoxyde dismutases (SOD) génèrent du peroxyde d'hydrogène selon la réaction suivante :



Le peroxyde d'hydrogène n'est pas une véritable forme radicalaire puisqu'il ne présente pas d'électron libre, mais en présence de métaux de transition comme le fer, le cuivre et le manganèse sous formes réduites, il se décompose pour donner naissance au radical hydroxyle (OH[•]) extrêmement réactif selon la réaction de Fenton :



La coexistence du peroxyde d'hydrogène, de métaux de transition et de l'anion $O_2^{\bullet-}$ est à l'origine du cycle d'Haber-Weiss classiquement écrit de la manière suivante :



Au cours de l'ischémie, l'acidose tissulaire est responsable de la délocalisation du fer de ses protéines de stockage comme la ferritine, favorisant la formation de radicaux hydroxyles (Oubidar *et al.*, 1994). Ainsi, la chélation ou la diminution du fer libre intracellulaire représente une approche de neuroprotection utilisée par différents auteurs (Selim & Ratan, 2004). Par exemple, l'utilisation du chélateur de fer, le 2,2'-dipyridyl conduit à une diminution importante du volume de lésion et des dommages neuronaux et endothéliaux observés suite à une ischémie focale par photothrombose (Demougeot *et al.*, 2004).

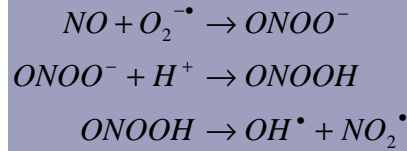
- Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un gaz radicalaire synthétisé par les NOS à partir de la L-arginine. Trois isoformes de NOS ont été identifiées au niveau cérébral (Bredt & Snyder, 1994) :

- la NOS neuronale (nNOS) constitutivement exprimée dans les neurones. Cette isoforme est cytosolique et Ca^{2+} -calmoduline dépendante,
- la NOS inducible (iNOS) dont l'expression peut être induite par différents stimuli. Cette isoforme, Ca^{2+} -calmoduline indépendante, est principalement retrouvée au niveau des cellules gliales (astrocytes et microglie) et des macrophages,
- la NOS endothéliale (eNOS) est trouvée principalement dans les cellules endothéliales. Cette isoforme est Ca^{2+} -calmoduline dépendante.

Il est important de souligner que cette classification n'est pas stricte puisqu'il a été mis en évidence que les neurones et les astrocytes sont respectivement capables d'exprimer l'iNOS et la nNOS (Galea *et al.*, 1992 ; Minc-Golomb *et al.*, 1996). Le NO est un messenger vasodilatateur susceptible d'améliorer la perfusion du territoire ischémié (Sun *et al.*, 2003a). Il possède également des effets antiagrégants plaquettaires (Radomski *et al.*, 1987).

Cependant, il peut aussi favoriser la production d'ions peroxynitrites (NO_2^\bullet) et de radicaux hydroxyyles après réaction avec l'anion superoxyde (Beckman & Kappenol, 1996) selon les réactions suivantes :



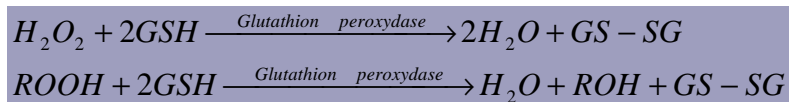
Il a ainsi été mis en évidence dans un modèle d'occlusion transitoire de l'ACM chez le Rat que l'inhibition de l'activité de l'iNOS par un traitement pharmacologique s'accompagnait d'une diminution du volume de la lésion (Parmentier *et al.*, 1999)

b/ Participation des radicaux libres aux dommages cellulaires post-ischémiques

Dans des conditions normales, l'organisme possède un ensemble de mécanismes de défense contre les RL : réactions enzymatiques, capture des métaux ou réactions avec des molécules anti-oxydantes. Parmi les enzymes, on peut citer l'isoforme CuZnSOD qui par son activité de dismutation participe à l'élimination des anions superoxydes naturellement générés lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le peroxyde d'hydrogène ainsi produit est alors transformé par la catalase en eau et oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



La glutathion peroxydase est également une enzyme dont l'activité permet la transformation du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes (ROOH) :



L'activité de la glutathion peroxydase nécessite la régénération du glutathion réduit (GSH) qui est assurée par la glutathion réductase à partir du NADPH. Les stocks de NADPH étant

maintenus grâce à l'oxydation du glucose dans la voie des pentoses phosphates, ce processus de protection est bloqué en cas de déficit énergétique.

Un autre mécanisme de protection consiste à réduire la disponibilité des métaux. Ainsi, un certain nombre de protéines comme la transferrine, la ferritine, la céruloplasmine ou les métallothionéines ont la capacité de fixer les métaux empêchant ces derniers d'induire la formation de RL (Kohgo *et al.*, 2008 ; Mackenzie *et al.*, 2008).

Finalement, un dernier mécanisme de protection non enzymatique implique des molécules anti-oxydantes qui réagissent avec les RL. On peut différencier les antioxydants liposolubles comme la vitamine E, la vitamine A ou les caroténoïdes principalement présents au niveau des membranes et les antioxydants hydrosolubles comme l'acide ascorbique, le glutathion ou l'acide urique.

Au cours de l'ischémie, l'équilibre entre la production de RL et leur inactivation par les mécanismes de défenses cellulaires est rompu. Il en résulte un stress oxydant responsable de dommages susceptibles de compromettre la viabilité cellulaire. Ces dommages touchent l'ensemble des constituants cellulaires (Flowers & Zimmerman, 1998).

- Effets macromoléculaires des radicaux libres

Les RL sont capables de réagir avec les lipides membranaires, les protéines et les acides nucléiques avec pour conséquences des altérations structurales et fonctionnelles pouvant conduire à la mort cellulaire.

Les acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires constituent une cible privilégiée des RL (Seisjö & Katsura, 1992). Leur structure moléculaire et leur organisation dans les membranes les rendent particulièrement vulnérables aux espèces radicalaires. La réaction est initiée par l'arrachement d'un hydrogène allylique d'un acide gras insaturé qui conduit à la formation d'un radical alkyle (L^{\bullet}). Il s'ensuit une phase de propagation pendant laquelle le réarrangement des doubles liaisons du radical conduit à la formation d'un diène conjugué qui va rapidement réagir avec l' O_2 pour former un radical peroxyde LOO^{\bullet} . Ce dernier est capable d'oxyder un autre acide gras pour former un nouveau radical alkyle et propager ainsi la réaction. Cette cascade de réactions, appelée peroxydation lipidique, conduit à la formation d'hydroperoxydes, d'endoperoxydes et d'aldéhydes.

Les perturbations de la fluidité membranaire sont l'une des conséquences majeures de la peroxydation lipidique. Elles conduisent à des altérations structurelles et fonctionnelles des membranes plasmiques mais aussi des différents organites cellulaires, voire même à une fragmentation membranaire (Chen & Yu, 1994 ; Lewen *et al.*, 2000). Les RL sont également

à l'origine d'une perméabilisation de la membrane mitochondriale déclenchant la formation de pores de transition de perméabilité (PTP) à l'origine du relargage du contenu de la mitochondrie vers le cytoplasme (Kristian & Siesjo, 1998). La production d'ATP est alors définitivement stoppée.

Les protéines sont également des composants très sensibles aux RL en raison de leur réactivité avec les molécules soufrées et insaturées (Davies, 1987). Les RL altèrent la structure des protéines en oxydant les chaînes latérales des acides aminés et en provoquant la rupture des ponts disulfures (Stadtman & Oliver, 1991). Ils sont aussi capables de modifier la charge protéique globale ou de décarboxyler ou désaminer les protéines (Nakazawa *et al.*, 1996). Les protéines ainsi oxydées perdent en général leur activité et deviennent particulièrement vulnérables à l'action des protéases. Par exemple, les RL perturbent et inhibent le fonctionnement de la créatine kinase (Yuan *et al.*, 1992) ou de la Na⁺/K⁺-ATPase (Jamme *et al.*, 1995).

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est également vulnérable à l'action des RL (Hemnani & Parihar, 1998). Ces derniers génèrent des cassures simples ou doubles brins et des modifications de paires de bases, entraînant ainsi des altérations structurales. Ces altérations peuvent entraîner des perturbations géniques et menacer la stabilité du génome. Il a notamment été montré que l'ADN mitochondrial était plus sensible au stress oxydatif que l'ADN nucléaire en raison de sa proximité avec la chaîne respiratoire (Lewen *et al.*, 2000). L'action des RL sur l'ADN s'accompagne de la mise en place de mécanismes de réparation, avec par exemple, l'activation de la PARP-1, une protéine dont le rôle important au cours de l'ischémie sera présenté plus en détails dans la partie II.

- Effets des radicaux libres sur l'expression génique

Les effets des RL ne sont pas uniquement cytotoxiques. En effet, ils sont capables d'activer divers facteurs de transcription susceptibles d'induire l'expression de protéines cytoprotectrices ou régulatrices de fonctions cellulaires (Schreck *et al.*, 1991 ; Liu *et al.*, 2005). NF-κB ("nuclear factor kappa B") est le premier facteur de transcription dont l'activation par les RL (peroxyde d'hydrogène, radical hydroxyle et anion superoxyde) a été démontrée (Scherck *et al.*, 1991). Il a également été mis en évidence que le facteur de transcription HIF-1α ("hypoxia inducing factor-1α") était stabilisé en présence de NO et d'anions superoxydes (Brune *et al.*, 2003, Callapina *et al.*, 2005). L'expression d'un troisième facteur de transcription, AP-1 ("activator protein-1") responsable de l'induction de protéines pro-apoptotiques est également augmentée par les RL (Wu *et al.*, 2005).

a/ Composante cellulaire de la réponse inflammatoire

- La microglie

Les cellules microgliales sont les cellules immunocompétentes et les macrophages résidents du SNC. L'activation de ces cellules lors d'une ischémie cérébrale s'accompagne d'une part, d'une libération de multiples composés tels que des cytokines, des facteurs de croissance, des protéases, du NO et des RL et d'autre part, d'un passage d'une morphologie ramifiée à une morphologie amiboïde associée à la mise en place d'une activité de phagocytose (Streit *et al.*, 1999). La nature et l'impact de l'activation microgliale post-ischémique seront abordés plus en détails dans la partie III.

- Les astrocytes

Pendant très longtemps, les astrocytes ont été uniquement considérés comme des cellules de soutien du parenchyme cérébral, participant au maintien de l'homéostasie ionique. En réponse à l'ischémie, ces cellules vont s'activer puis proliférer. Cette activation astrocytaire est associée à de nombreux changements structuraux assurés notamment par une synthèse accrue de la protéine GFAP ("glial fibrillary acidic protein") constituant les filaments intermédiaires (Eng *et al.*, 1992 ; Wilhelmsson *et al.*, 2004). Elle s'accompagne également d'une production de nombreux facteurs parmi lesquels des cytokines, du NO, des facteurs de croissance et des RL (Swanson *et al.*, 2004). A des temps post-ischémiques longs, les astrocytes vont s'assembler afin de former une cicatrice gliale autour de la zone lésée dont les conséquences ne sont cependant pas clairement identifiées à ce jour. La cicatrice permettrait de limiter l'étendue de la lésion en isolant la zone endommagée. Cependant, si des études ont montré son effet potentiellement bénéfique au cours de la phase aiguë de l'ischémie, la prolifération astrocytaire pourrait compromettre la phase de reconstruction du réseau neuronal (Panickar & Norenberg, 2005 ; Pekny & Peckna, 2005). En effet, la cicatrice gliale formerait une barrière s'opposant à l'établissement de nouvelles connections entre les neurones survivants (Ribotta *et al.*, 2004).

- Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales sont également des acteurs cellulaires essentiels de la RI (del Zoppo, 2009). En effet, se situant à l'interface entre le parenchyme cérébral et la circulation sanguine, elles orchestrent le recrutement et l'infiltration des différents types cellulaires circulants (Okada *et al.*, 1994 ; Haring *et al.*, 1996). De plus, elles constituent une source de médiateurs de l'inflammation (cytokines, RL) (Amantea *et al.*, 2008).

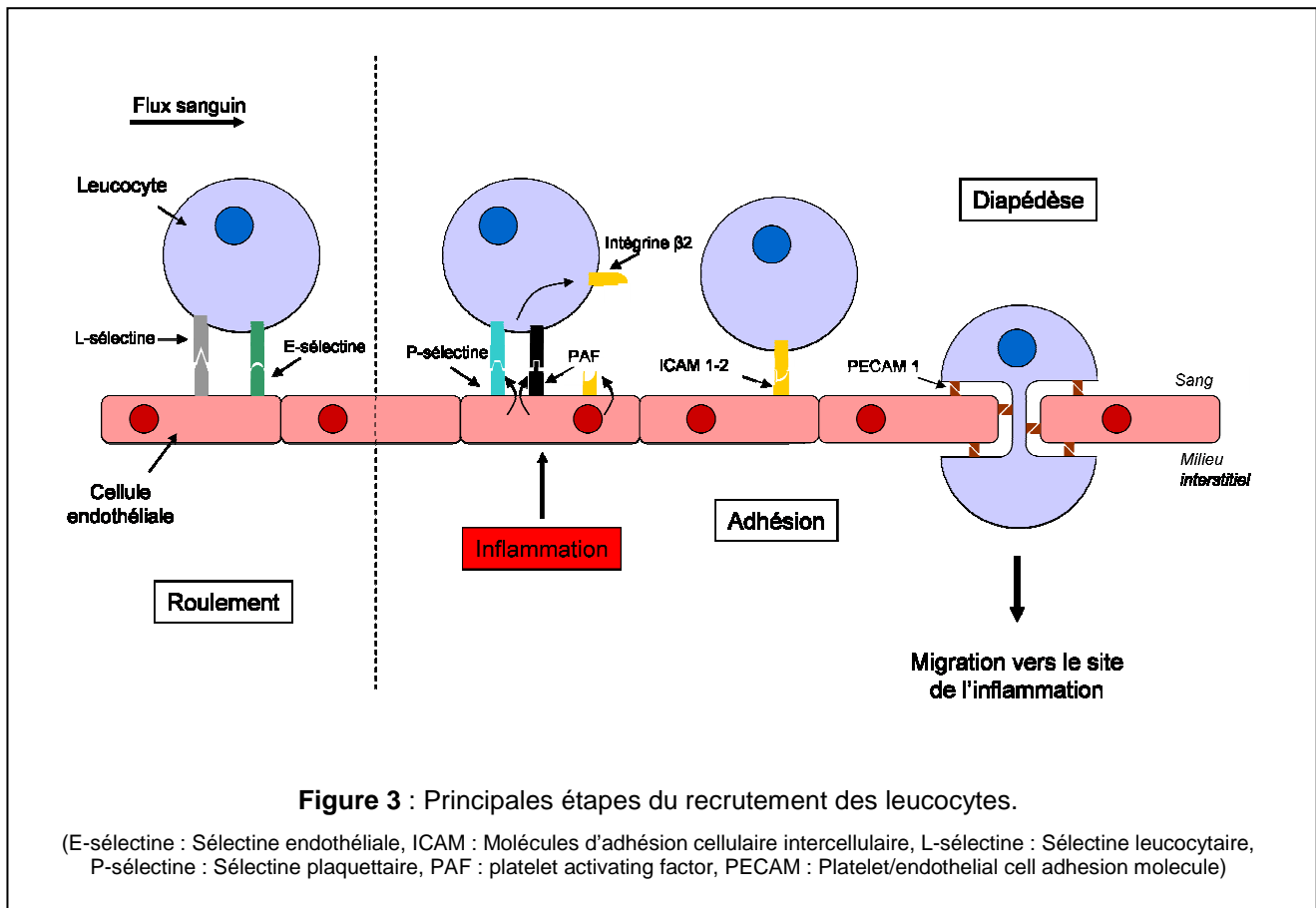
- Les leucocytes

Les leucocytes sont les cellules circulantes du système immunitaire. Au cours de la RI induite par l'ischémie cérébrale, ils s'infiltrent dans le SNC et migrent jusqu'à la zone lésée. Le recrutement des leucocytes comprend trois étapes majeures : le roulement, l'adhésion et la diapédèse (voir figure 3).

Le **roulement** correspond à l'interaction faible et transitoire des leucocytes avec les cellules endothéliales. Cette interaction dépend de l'expression de diverses molécules d'adhésion cellulaire (CAM) à la surface des différents types cellulaires impliqués (Bargatze *et al.*, 1994). Ainsi, la L-sélectine (sélectine leucocytaire) exprimée constitutivement à la surface des leucocytes, interagit avec différentes CAM, parmi lesquelles GlyCAM 1 et 2 ("glycosylation dependent CAM") et MadCAM ("mucosal vascular addressin CAM") présentes à la surface des cellules endothéliales. De manière équivalente, la E-sélectine (sélectine endothéliale) exprimée constitutivement à la surface des cellules endothéliales, interagit avec des oligosaccharides présents à la surface des leucocytes. Ces interactions cellulaires, conduisent au ralentissement des leucocytes entraînés par le flux sanguin (Mc Ever, 2002).

Ce ralentissement est nécessaire à l'établissement d'interactions fortes avec les cellules endothéliales afin de permettre l'étape d'**adhésion**. Ainsi, les cellules endothéliales à proximité du site de l'inflammation expriment à leur surface un ensemble de protéines telles que la P-sélectine (sélectine plaquettaire) et le "platelet activating factor" (PAF) qui vont être reconnus par les leucocytes. Cette reconnaissance induit alors l'expression leucocytaire d'intégrines responsables de l'adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales (Albelda, 1991). Par exemple, l'interaction forte des intégrines $\beta 2$ avec ICAM 1 et 2 (CAM intercellulaire) conduit à l'immobilisation des leucocytes (Ley *et al.*, 2007).

Les leucocytes vont finalement traverser la paroi vasculaire en passant entre les cellules endothéliales selon un processus actif appelé la **diapédèse**. Cette traversée est, entre autre, rendue possible grâce à l'interaction entre les protéines PECAM-1 ("platelet/endothelial CAM") exprimées conjointement à la surface des leucocytes et des cellules endothéliales (Muller *et al.*, 1993). Les leucocytes sécrètent également des protéases capables de dégrader la lame basale, ce qui facilite leur extravasation hors des vaisseaux. Une fois dans le parenchyme cérébral, les leucocytes migrent vers le foyer inflammatoire selon un gradient des marqueurs de l'inflammation.



- Les polynucléaires neutrophiles

Les neutrophiles sont généralement les premiers leucocytes à être recrutés. Ils commencent à s'accumuler au sein des tissus lésés 4 à 6 h post-ictus pour atteindre une infiltration maximale à 3 j, puis leur nombre diminue rapidement (Kriz, 2006). Ils semblent avoir globalement un rôle délétère au cours de l'ischémie (Hallenbeck, 1996 ; Emerich *et al.*, 2002). En effet, différentes expériences d'inhibition de la diapédèse par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les CAM ou de souris "knock out" (KO) pour des protéines telles que ICAM-1 ou la P-sélectine, ont permis de diminuer le volume de la lésion, l'œdème, le déficit neurologique et la mortalité post-ischémique (Jin *et al.*, 2010). Cependant, les mécanismes exacts de la pathogénicité des neutrophiles ne sont pas clairement déterminés. Plusieurs hypothèses ont été avancées telles que la synthèse de RL, le relargage de cytokines pro-inflammatoires et de métalloprotéinases matricielles (MMP) et l'induction de la synthèse de CAM.

- Les lymphocytes

Les lymphocytes infiltrent la lésion plus tardivement, entre 3 et 7 j après l'ischémie. Une dualité d'effets a été rapportée entre les différents types lymphocytaires. En effet, les

lymphocytes T helper 1 (TH1) CD4⁺ (cluster de différenciation) exerceraient un effet délétère via le relargage de cytokines pro-inflammatoires alors que les lymphocytes TH2 CD4⁺ induiraient un effet bénéfique via la synthèse de cytokines anti-inflammatoires (Arumugam *et al.*, 2005). De même, les lymphocytes T_{reg} auraient plutôt un effet protecteur en diminuant l'intensité de la RI via un contrôle de l'activation et de la prolifération des lymphocytes et de la microglie. Ce contrôle passerait par la synthèse d'IL-10 (interleukine). En effet, en réponse à une ischémie transitoire obtenue par une occlusion de 30 min de l'ACM, des souris Rag 2 ("recombination activating gene 2")^{-/-}, souffrant d'un déficit en lymphocytes matures présentent des volumes de lésion plus importants après injection de lymphocytes T_{reg} issus de souris KO pour IL-10 que celles ayant reçus des lymphocytes T_{reg} issus de souris sauvages (Liesz *et al.*, 2009).

- Les monocytes

L'infiltration de la lésion ischémique par les monocytes débute au bout de 2 j et est maximale après une semaine. Une fois infiltrés, les monocytes se différencient en macrophages et acquièrent une activité de phagocytose et de synthèse de médiateurs de l'inflammation (Schilling *et al.*, 2003). Cette activation s'accompagne de changements morphologiques et fonctionnels qui ne permettent plus de les différencier des cellules microgliales activées. Les deux populations sont donc considérées comme une seule et leurs effets sont souvent confondus. Des protocoles ont cependant été développés afin de permettre l'étude séparée des deux populations cellulaires. Ces techniques seront détaillées dans la partie III.

• Les autres types cellulaires

Les oligodendrocytes qui assurent la myélinisation des axones sont aussi une source de molécules de l'inflammation en réponse à une ischémie cérébrale (Allan & Rothwell, 2003). L'ischémie s'accompagne également du recrutement de cellules dendritiques et de mastocytes, qui infiltreront rapidement la lésion. Les mastocytes en altérant la perméabilité de la BHE, via le relargage d'histamine ainsi que de protéases dégradant la MEC, seraient aussi impliqués dans la formation de l'œdème vasogénique et l'infiltration des neutrophiles (Strbian *et al.*, 2009). Ainsi, l'inhibition de la dégranulation des mastocytes à l'aide d'un traitement par un agent stabilisateur des membranes -le cromoglycate de sodium- diminue l'œdème de 39 % tandis que le composé 48/80, un agent induisant à l'inverse, une dégranulation mastocytaire, augmentant l'œdème de 89 % (Strbian *et al.*, 2006). Enfin, même s'il a

récemment été montré que les cellules dendritiques s'accumulaient dans la région infarctée 24 h après l'induction d'une ischémie focale, l'implication exacte de ces cellules sur le développement de la lésion reste à élucider (Felger *et al.*, 2010).

b/ Composante biochimique de la réponse inflammatoire

Tous les acteurs cellulaires précités sont capables de libérer des médiateurs de l'inflammation dont les principaux sont les suivants :

- Les cytokines

Les cytokines forment un groupe de petites glycoprotéines produites par les cellules du système immunitaire en réponse à la présence d'un antigène. Ces molécules solubles sont essentielles à la communication cellulaire et leur action via des récepteurs spécifiques peut être paracrine, endocrine ou autocrine. En réponse à une ischémie cérébrale, les cytokines ne sont pas produites seulement par les cellules du système immunitaire, mais également par les cellules résidentes telles que la microglie, les astrocytes et les neurones. Elles joueraient un rôle essentiel dans l'expression des CAM et donc dans le recrutement des leucocytes (Ley *et al.*, 2007).

Parmi la centaine de cytokines caractérisées à ce jour, certaines comme IL-1 β et TNF- α ("tumor necrosis factor α "), exercent des effets délétères en amplifiant la mort cellulaire post-ischémique. Ainsi, l'injection d'IL-1 β chez des rats soumis à une ischémie transitoire par occlusion de l'ACM conduit à une augmentation de la taille de la lésion. A l'inverse, des souris déficientes pour IL-1 β soumises au même modèle d'ischémie présentent des volumes de lésions plus faibles que ceux observés chez des souris sauvages (Yamasaki *et al.*, 1995). Cependant, l'injection d'IL-1 β à des souris ischémiées KO pour le récepteur IL-1R1 (récepteur 1 à IL-1) induit des effets similaires à ceux observés chez les souris sauvages, suggérant que les mécanismes d'action mis en œuvre et les récepteurs impliqués restent encore à caractériser (Gibson *et al.*, 2004). Dans le cas du TNF- α , son action délétère a été révélée par l'utilisation d'anticorps spécifiques induisant une réduction du volume de la lésion (Yang *et al.*, 1998). Elle s'exercerait via son interaction avec les récepteurs associés à des domaines de mort dont l'activation conduit au déclenchement de l'apoptose (Hallenbeck, 2002).

A l'inverse, certaines cytokines comme IL-10 et TGF- β ("transforming growth factor β ") exercent un effet neuroprotecteur. En effet, IL-10 en diminuant à la fois la synthèse d'IL-1 β et de TNF- α , et l'expression des récepteurs aux cytokines, réduit les dommages post-

ischémiques (Wang & Yenari, 2007). Ainsi, l'injection d'IL-10 à des rats soumis à une occlusion permanente de l'ACM diminue significativement la taille de la zone infarctée (Spera *et al.*, 1998). De la même manière, il a été montré que la surexpression de TGF- β chez la souris conduisait à une réduction de la synthèse de cytokines (MCP-1 ("monocyte chemoattractant protein 1") et MIP-1 ("macrophage inflammatory protein 1")) associée à une protection neuronale en réponse à une occlusion de 30 min de l'ACM (Pang *et al.*, 2001).

Par ailleurs, il existe également des cytokines dont les effets ne sont pas clairement définis (IL-6, IL-18...). Par exemple, les résultats d'études sur les effets de l'IL-6 menées chez la souris sont contradictoires. En effet, Clark *et al.* (2000) n'ont mis en évidence aucune différence au niveau de la taille de la lésion ou du score neurologique entre des souris KO pour IL-6 et des souris sauvages soumises à une ischémie cérébrale. Cependant, Herrmann *et al.* (2003) ont observé une augmentation de la taille de la lésion ainsi qu'une diminution du score neurologique et de la survie chez des souris déficientes en IL-6 par rapport aux souris sauvages suite à une ischémie cérébrale. A l'inverse, Smith *et al.* (2004) ont mis en évidence une corrélation entre le taux d'IL-6 circulant et la taille de la lésion ainsi que le déficit fonctionnel

L'ischémie cérébrale s'accompagne également de la synthèse de chemokines qui sont une famille de cytokines de faible masse moléculaire jouant un rôle dans le chimiotactisme et le recrutement des cellules immunitaires (Lakhan *et al.*, 2009). Il existe 4 familles de chemokines regroupées en fonction de l'organisation de leurs résidus cystéines : C, CC, CXC, CX3C. Il a été mis en évidence que l'ischémie s'accompagne d'une augmentation des taux de MCP-1 (ou CCL2), de MIP- α (ou CCL3) ainsi que de fractalkine (CX3CL1) (Tarozzo *et al.*, 2002 ; Chen *et al.*, 2003 ; Denes *et al.*, 2008). Les chemokines ont longtemps été désignées comme jouant un rôle délétère au cours de l'ischémie en participant au recrutement des cellules immunitaires circulantes considérées comme responsables d'une aggravation de la mort cellulaire (Emsley & Tyrrell, 2002). Cependant, des études récentes révèlent que leur rôle est plus complexe. En effet, des souris n'exprimant pas le récepteur aux chemokines CCR-5 présentent une mort neuronale plus importante en réponse à une occlusion permanente de l'ACM comparativement aux souris sauvages (Sorce *et al.*, 2010). A l'opposé, des souris déficientes cette fois-ci pour le récepteur CCR-2 présentent une diminution des dommages induits par une occlusion transitoire de l'ACM (Dimitrijevic *et al.*, 2007).

- Facteurs de croissance

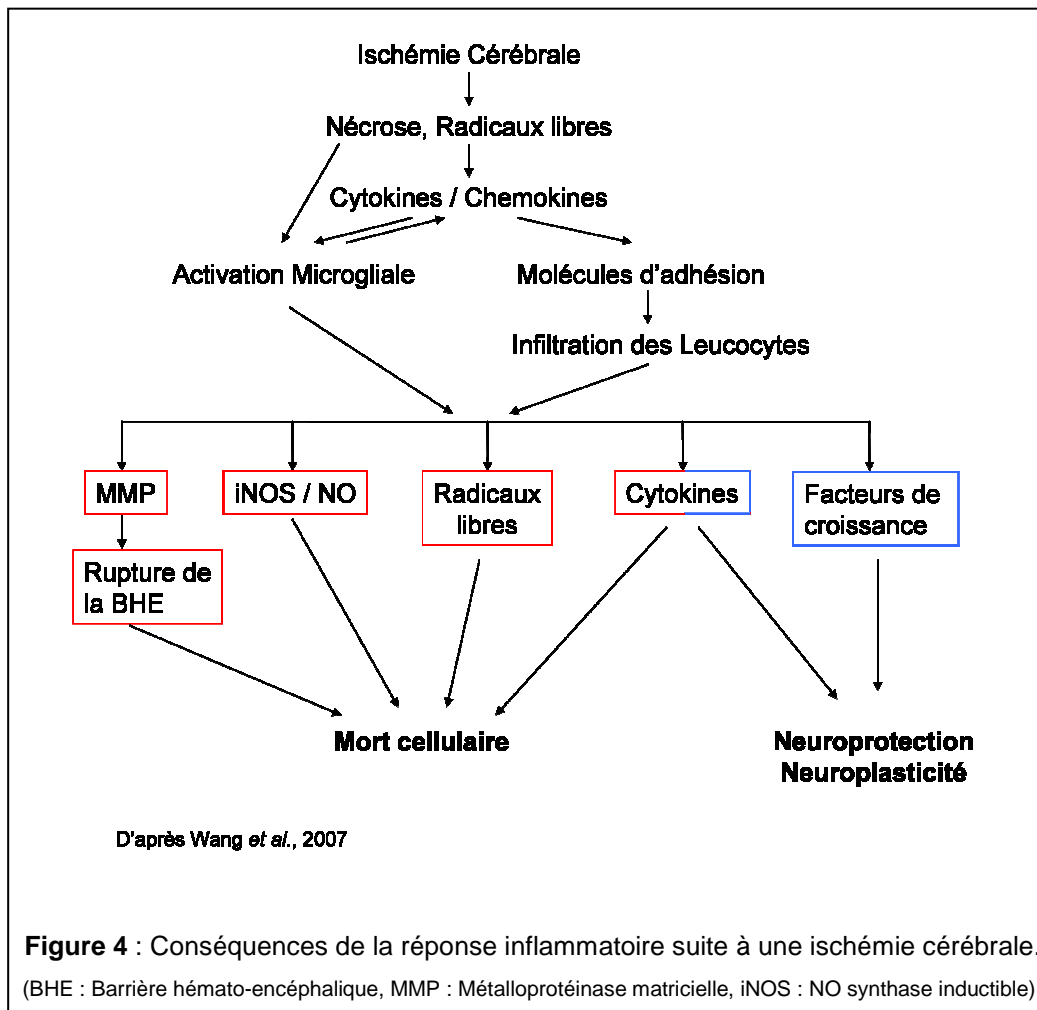
La RI post-ischémique s'accompagne également de la synthèse de nombreux facteurs de croissance (Komitova *et al.*, 2006 ; Wieloch & Nikolich, 2006). Ces facteurs de croissance exercent un effet protecteur au cours de la phase aiguë de l'ischémie en favorisant la survie cellulaire. Plus tardivement, ils promeuvent la neuroplasticité à l'origine d'une augmentation de la récupération fonctionnelle (Greenberg & Jin, 2006). Des études ont notamment montré que les cellules gliales, en particulier la microglie, synthétisaient des facteurs neurotrophiques tels que IGF-1 ("insuline growth factor-1"), BDNF et NGF ("nerve growth factor") en réponse à une ischémie cérébrale (Kriz & Lalancette-Hébert, 2009). Les mécanismes de la neuroplasticité et le rôle des facteurs de croissance seront abordés plus en détails dans la partie IV.

- Métalloprotéinases matricielles

La RI s'accompagne également de la synthèse de MMP en particulier MMP-2 et 9, qui détruisent les protéines de la MEC dont la fonction est de participer à la cohésion entre les cellules endothéliales, les astrocytes et la lame basale des vaisseaux constituant la BHE (Jin *et al.*, 2010). Les MMP fragilisent la BHE et permettent l'**infiltration** des leucocytes qui participent à la RI (Kelly *et al.*, 2006). Les MMP favorisent également la **migration** des cellules immunitaires via la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) (del Zoppo, 2010). La source principale des MMP au cours de l'ischémie est la microglie. Des études *in vitro* utilisant des cultures primaires de microglie ont en effet mis en évidence que l'inhibition de l'activation microgliale est associée à un blocage de l'activité MMP-9 et à une diminution de la neurotoxicité induite par les cellules microgliales lorsqu'elles sont cultivées avec des neurones (Kauppinen *et al.*, 2005). De même, l'utilisation d'un inhibiteur des MMP permet de diminuer la mortalité associée à une occlusion de l'ACM (Pfefferkorn & Rosenberg, 2003). Cependant, il existe de plus en plus d'arguments montrant qu'à des temps post-ischémiques plus longs, les MMP seraient également susceptibles de favoriser la plasticité neuronale et la récupération fonctionnelle post-ischémique en facilitant la réorganisation de la matrice cérébrale (Jian Liu & Rosenberg, 2005 ; Zhao *et al.*, 2006 ; del Zoppo *et al.*, 2007).

La RI via ses composantes cellulaires et biochimiques est un processus très complexe jouant un rôle ambigu. D'une part, l'inflammation s'accompagne d'effets délétères (œdème, synthèse de composés cytotoxiques, rupture de la BHE) et d'autre part, elle peut induire des effets bénéfiques (neuroprotection, cicatrice gliale et synthèse de facteurs trophiques) (voir

figure 4). L'impact général de la RI au niveau cérébral, longtemps considéré comme essentiellement négatif, est donc à nuancer.



6) Mort cellulaire post-ischémique

a/ Nécrose

L'acidose, l'altération des flux ioniques et hydriques, la perturbation du métabolisme des neurotransmetteurs, la production de RL et la RI s'accompagne d'une mort cellulaire par nécrose. Ainsi, des cellules nécrotiques sont observées dans l'ensemble de la lésion ischémique (pour revue, Lipton, 1999).

La nécrose est une mort cellulaire non programmée qui se caractérise généralement par des modifications du cytoplasme qui devient éosinophile et parfois vacuolaire. Le noyau se condense, l'ADN se fragmente de façon aléatoire. Au stade final, le noyau est progressivement dégradé et se rompt en de multiples fragments. La lyse de la membrane plasmique s'accompagne d'un relargage du contenu intracellulaire favorisant l'activation de

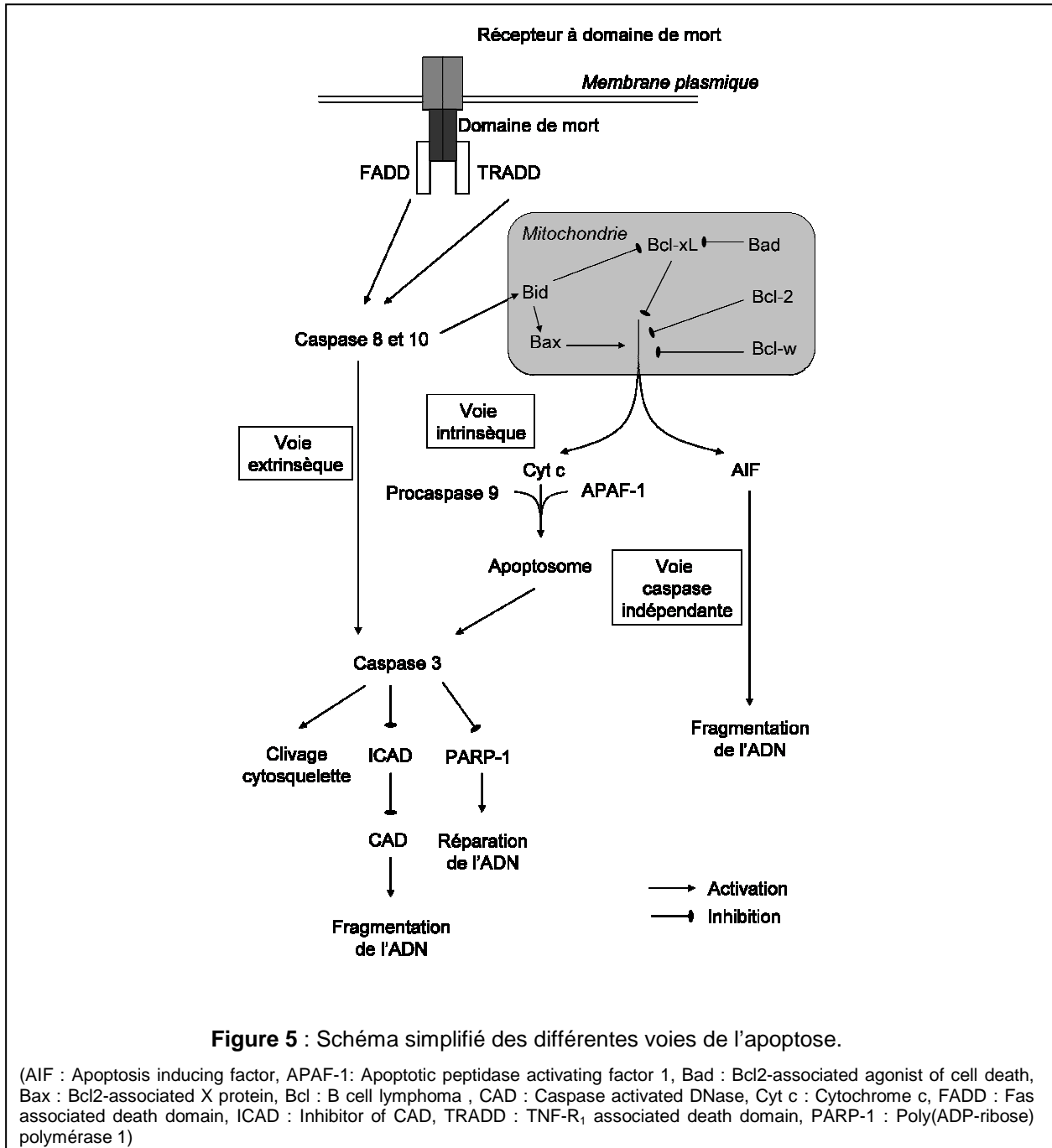
la RI. A la différence de l'apoptose, la nécrose n'apparaît qu'en réponse à une agression exogène.

b/ Apoptose

La mort cellulaire au niveau de la lésion ischémique a longtemps été considérée comme uniquement de nature nécrotique. Il est maintenant largement démontré qu'une partie des cellules cérébrales meurt également selon un processus apoptotique (Linnick *et al.*, 1993).

L'apoptose correspond, tout d'abord, à un processus de mort cellulaire programmée impliqué dans de nombreux processus physiologiques tels que le développement, la différenciation et l'homéostasie cellulaire (Alberts *et al.*, 2007). Du point de vue histologique, l'apoptose se caractérise par une condensation du cytoplasme, du noyau et de la chromatine. L'ADN est dégradé de manière régulière en fragments internucléosomiaux de 180 pb (paires de bases). Enfin, la membrane plasmique bourgeonne et forme des corps apoptotiques rapidement phagocytés par les cellules voisines (pour revue, Lopez-Neblina *et al.*, 2005). L'apoptose représente donc une forme de « suicide » de la cellule qui à la différence de la nécrose ne déclenche pas de RI (Mehta *et al.*, 2007).

Le processus d'apoptose peut également être initié dans des conditions physiopathologiques, en particulier l'ischémie cérébrale (Niizuma *et al.*, 2010). Plusieurs familles de protéines jouent un rôle essentiel dans ce processus. Ainsi, les caspases forment une famille de protéases à cystéine aspartate composée d'environ 15 représentants. Leur activation conduit au clivage de protéines intracellulaires à l'origine de modifications ultrastructurales spécifiques. Elles sont classiquement réparties en 2 groupes en fonction de la longueur de leur prodomaine. Celui-ci est court pour les caspases effectrices de la mort cellulaire (caspase-3 et -7) et long pour les autres caspases dites initiateuses (caspase-8, -9, -10) qui, dans la cascade protéolytique, se situent en amont (Fan *et al.*, 2005 ; Alenzi *et al.*, 2010). Une autre famille de protéines, localisées dans la membrane externe de la mitochondrie, exerce un rôle important dans le processus apoptotique : la famille Bcl ("B cell lymphoma"). Cette dernière regroupe une trentaine de représentants dont le chef de file est Bcl-2 (Thomadaki & Scorilas, 2006). Ces protéines exercent des effets pro- ou anti-apoptotiques en modulant la libération dans le cytosol d'éléments apoptogènes tels que le cytochrome c ou DIABLO/Smac (Second mitochondria-derived activator of caspase) (Naka *et al.*, 2008).



Classiquement, trois voies d'induction de l'apoptose ont été rapportées (figure 5). Tout d'abord, on distingue la voie intrinsèque caractérisée par le relargage du cytochrome c. Ce relargage conduit à la formation de l'apoptosome, structure nécessaire à l'activation des caspases effectrices (Zou *et al.*, 1999 ; Denault & Salvesen, 2008). On différencie également la voie extrinsèque qui s'exécute via l'activation des récepteurs membranaires à domaine de mort (récepteurs au TNF). L'activation de ces récepteurs est à l'origine du recrutement de protéines adaptatrices capables d'activer à leurs tours certaines caspases initiatrices (Jin *et al.*, 2001). Enfin, plus récemment, une voie indépendante des caspases mettant en jeu la protéine

AIF ("apoptosis inducing factor") a été identifiée (Susin *et al.*, 1999). Le relargage d'AIF par la mitochondrie qui semble passer par son clivage par la calpaïne, permettant son activation et sa translocation dans le noyau (Mizukoshi *et al.*, 2010), est initié par différents facteurs dont PARP-1 (cf partie II). La translocation d'AIF de la mitochondrie vers le noyau conduira alors via son activité endonucléasique à une fragmentation régulière de l'ADN en fragment de 50 pb (Wang *et al.*, 2009).

c/ Autophagie

L'autophagie est un processus d'autodigestion consistant en une dégradation de composants intracellulaires par les enzymes lysosomales localisées dans une vésicule appelée lysosome ou autophagosome selon le type d'autophagie. En effet, on distingue trois types d'autophagie (figure 6) : la microautophagie et l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes et co-chaperonnes qui sont reconnues par des récepteurs (LAMP-2A : "lysosomal-associated membrane protein 2"), qui se déroulent au niveau du lysosome et la macroautophagie, la forme principale, qui s'exécute dans l'autophagosome (Puyal *et al.*, 2009). L'autophagie joue un rôle physiologique important dans la croissance cellulaire, la différenciation et surtout le maintien de l'homéostasie cellulaire. Il est important de préciser qu'à la différence du système ubiquitine-protéasome responsable de la dégradation des protéines à durée de vie courte, l'autophagie est le principal mécanisme impliqué dans le catabolisme des organites et des protéines à durée de vie longue (Andermarcher *et al.*, 2005 ; Tanida, 2011). Près d'une trentaine de gènes seraient impliqués dans la régulation des mécanismes autophagiques (Puyal *et al.*, 2009). Dans le cas de la macroautophagie, le processus autophagique nécessite au préalable la formation d'un pré-autophagosome qui semble être issu de la nucléation de la membrane du réticulum endoplasmique (Suzuki & Ohsumi, 2010). La fermeture de ce pré-autophagosome qui conduit à l'internalisation des organites et des protéines à dégrader est suivie de la fusion de ce dernier avec des lysosomes nécessaires à la dégradation de son contenu.

Dans certaines conditions physiopathologiques dont l'ischémie, une dérégulation de ce mécanisme peut conduire à une digestion excessive des composants cellulaires compromettant la survie des cellules. Ainsi, celles mourant par autophagie se caractérisent par la présence d'autophagosomes associée à une disparition d'organites. Des études récentes sur des cellules incapables d'exprimer les protéines pro-apoptotique Bax ("Bcl2-associated X protein") et Bak ("Bcl2-antagonist/killer"), ce qui leur confère une résistance à l'apoptose, ont permis de montrer que ces cellules étaient capables de mourir de manière totalement

dépendante de l'autophagie (Shimizu *et al.*, 2004). L'ischémie cérébrale s'accompagne d'une activité autophagique (Uchiyama *et al.*, 2008), responsable de la mort d'un certain nombre de neurones (Wang *et al.*, 2008). Ainsi, des neurones n'exprimant pas Atg7 ("autophagy related gene"), une des protéines impliquée dans la formation et le développement du pré-autophagosome, présentent une très forte résistance à l'ischémie et l'hypoxie (Koike *et al.*, 2008).

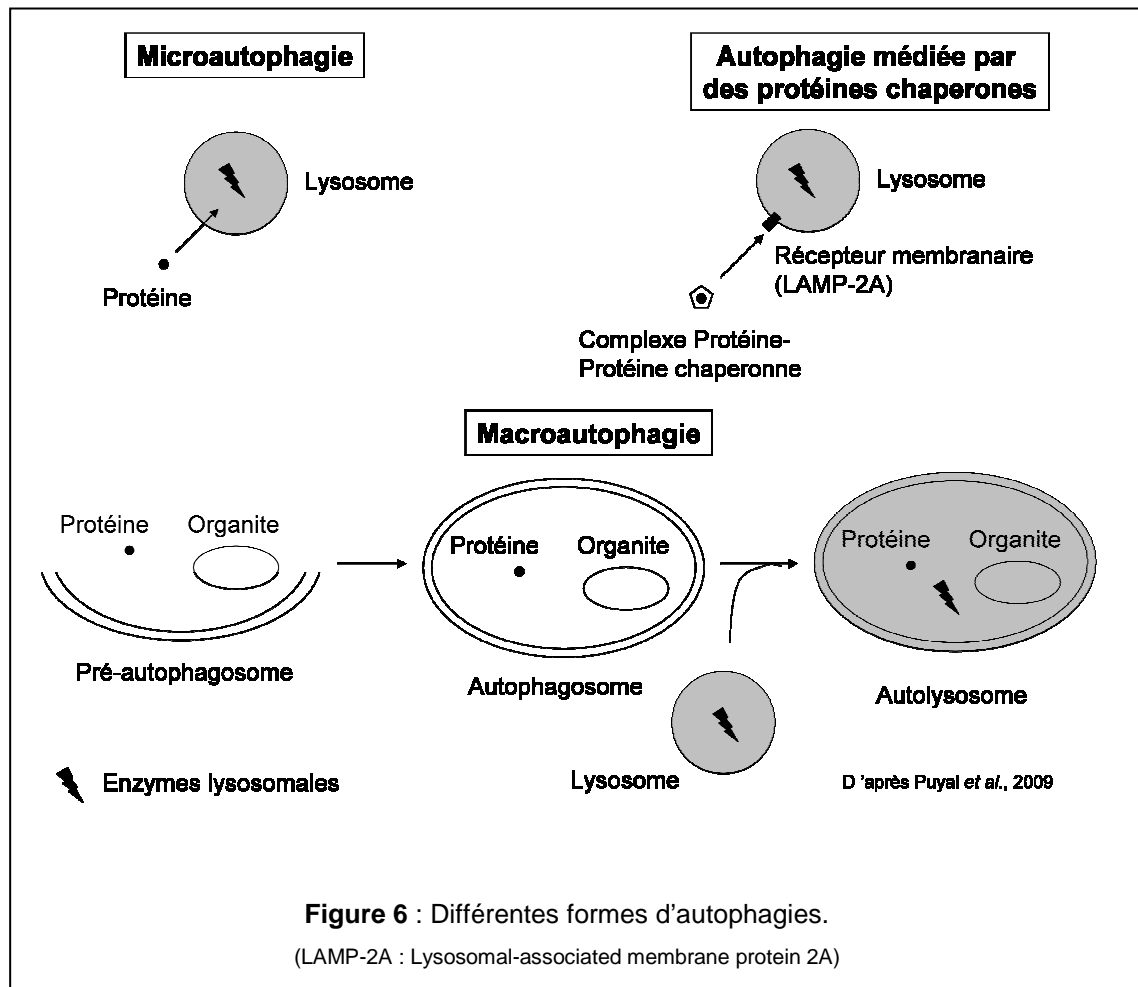


Figure 6 : Différentes formes d'autophagies.
(LAMP-2A : Lysosomal-associated membrane protein 2A)

C Pénombre ischémique

1) Notion de débit sanguin

Comme évoqué précédemment, l'arrêt de l'apport en oxygène et en glucose conduit rapidement à la mort des cellules cérébrales au cours de l'AVC ischémique. Cependant, les conséquences de l'AVC dépendent de plusieurs facteurs :

- l'importance de la réduction du débit sanguin : il n'y a pas de relation linéaire entre l'importance des dommages et le débit sanguin cérébral, mais il existe des valeurs seuils à partir desquelles des altérations vont se produire (Astrup, 1981). Schématiquement, une diminution d'environ 50 % du débit sanguin entraîne peu d'effets notables, la réduction du débit pouvant être compensée par une augmentation de l'extraction de l'O₂ du sang. Une première valeur critique, appelée seuil fonctionnel, est atteinte lorsque la réduction atteint 60 % du débit initial. Elle se caractérise par la perte réversible des activités électriques et des transmissions synaptiques. La seconde valeur critique, dite seuil membranaire, est atteinte pour une réduction de 80 % du débit initial. Elle est associée à l'apparition d'une défaillance membranaire irréversible et à l'évolution inéluctable vers la mort cellulaire (Prieto *et al.*, 2005).

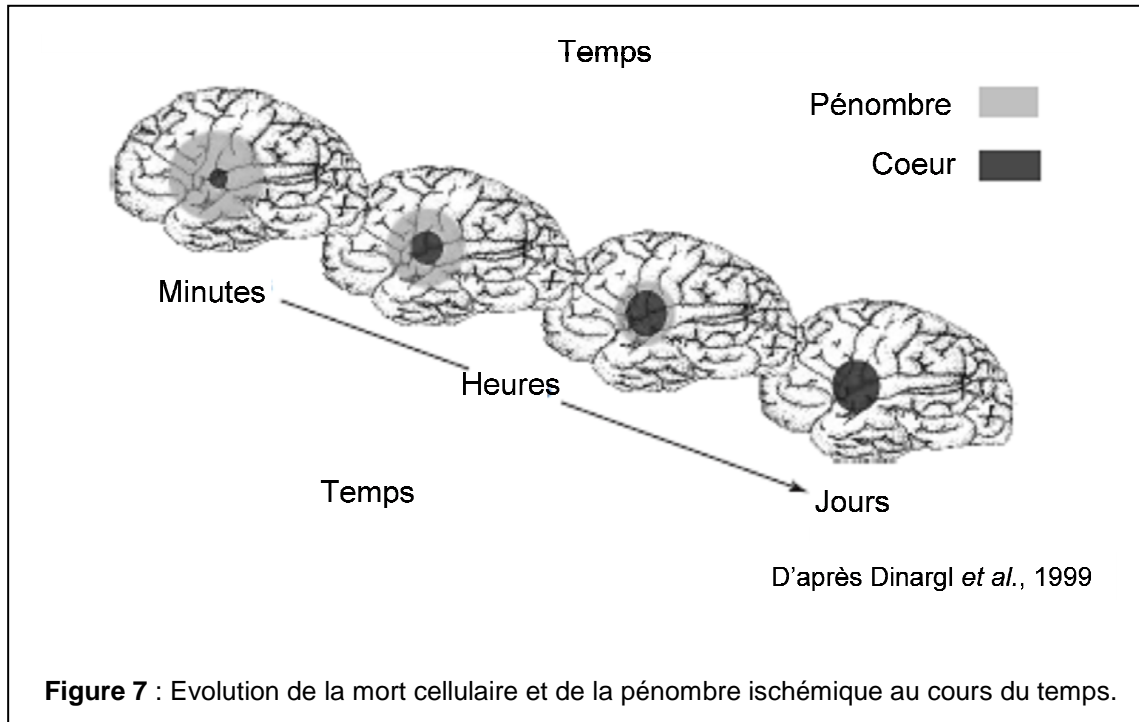
- la vulnérabilité des cellules à l'ischémie : certaines populations neuronales sont particulièrement sensibles. En effet, les neurones du striatum, de la couche CA₁ (corne d'Ammon) de l'hippocampe et des couches III, V et VI du cortex sont particulièrement vulnérables à une diminution du débit sanguin (Kirino *et al.*, 1982 ; Pulsinelli *et al.*, 1982).

- la durée de l'AVC : les dommages sont d'autant plus importants que la durée de l'ischémie est longue (Zivin, 1998).

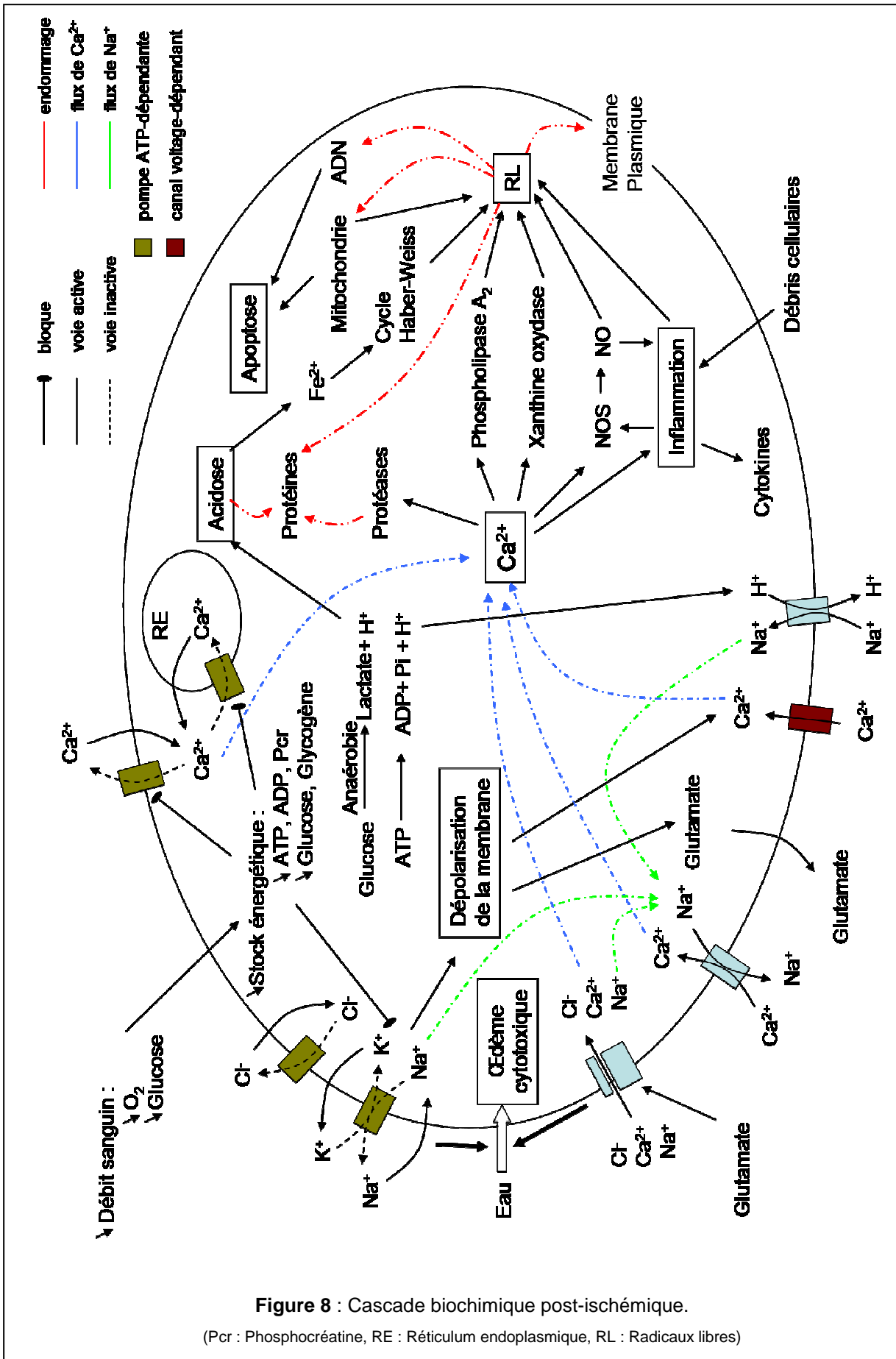
2) Cœur et pénombre ischémique

A l'issue de l'AVC ischémique, on peut différencier deux zones au niveau de la lésion : le cœur et la pénombre. Le cœur correspond à la zone où le débit sanguin est inférieur à 20 % du débit normal. Cette région regroupe les cellules les plus sévèrement affectées qui vont mourir rapidement par lipolyse, protéolyse et dégradation des microtubules suite au déficit énergétique et à la dépolarisation qui l'accompagne (Dirnagl *et al.*, 1999). La pénombre correspond à la zone où le débit sanguin est compris entre 20 et 40 % du débit normal et comprend des cellules moins gravement touchées. Cette région peut représenter jusqu'à plus de 50 % du volume infarcté final (Mergenthaler *et al.*, 2004) et en absence de reprise du débit sanguin ou d'intervention thérapeutique, les cellules vont inéluctablement évoluer vers la mort (figure 7).

A l'heure actuelle, le seul traitement indiqué dans l'AVC est le r-tPA qui est un fibrinolytique permettant de recanaliser les vaisseaux occlus. Cependant, sa fenêtre thérapeutique n'étant que de 4h30, le nombre de patients susceptibles de bénéficier du traitement est faible. De plus, son utilisation est à proscrire dans les AVC hémorragiques. Au final, moins de 2 % des patients victimes d'un AVC seront traités au r-tPA (Mahagne, 2008).



La physiopathologie de l'AVC ischémique regroupe donc de multiple processus constituant une cascade biochimique complexe dont certains évènements majeurs sont regroupés dans la figure 8.

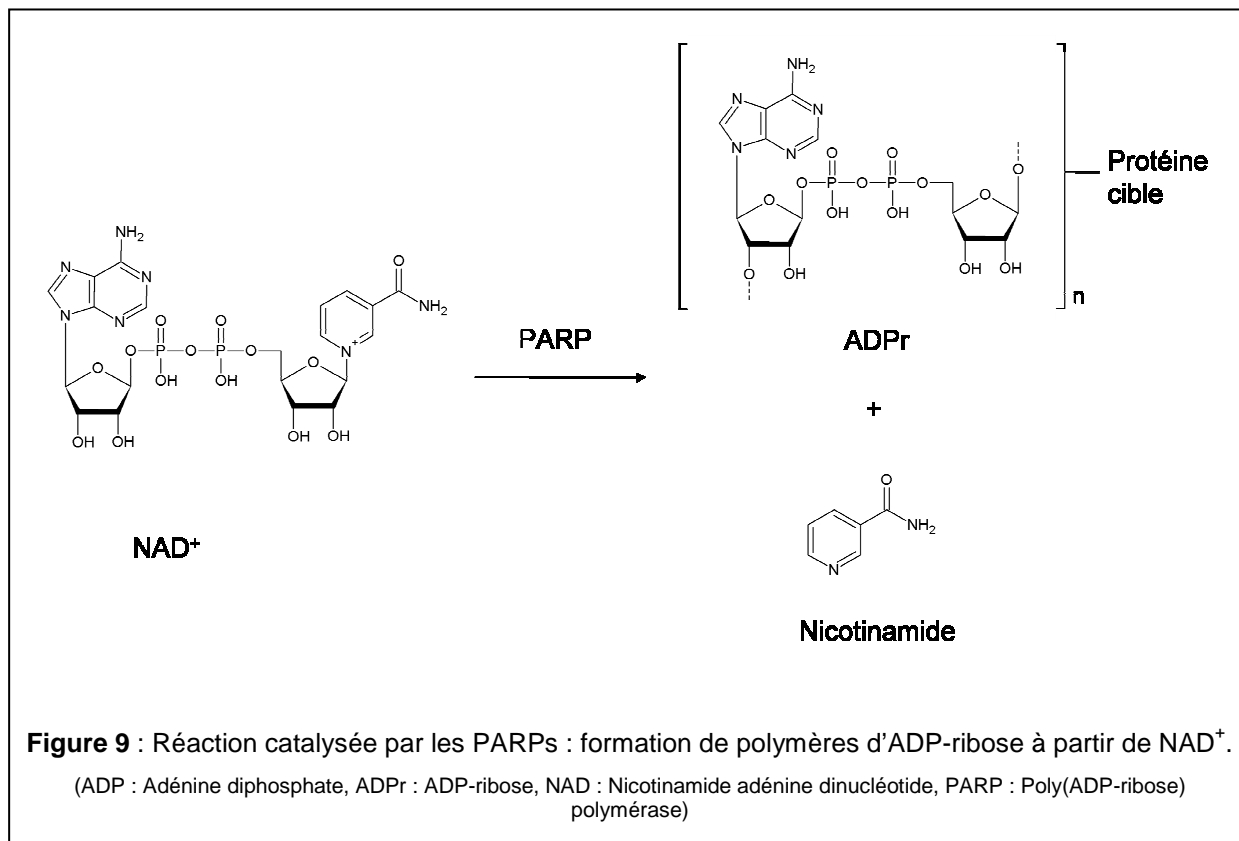


II La poly(ADP-Ribose) polymérase 1

A Structure et activité

Les poly(ADP-ribose) polymérases (PARPs) constituent une famille d'enzymes comportant 18 représentants (Ame *et al.*, 2004) qui catalysent la synthèse de polymères d'ADP-ribose (PARs) à partir de NAD⁺ (nicotinamide adénine dinucléotide) (figure 9). Ce processus physiologique appelé poly(ADP-ribosyl)ation a pour rôle de favoriser le déclenchement des mécanismes de réparation des cassures de l'ADN.

PARP-1, identifiée pour la première fois dans les années 1960 (Chambon *et al.*, 1963), est l'isoforme la plus représentée dans la famille des PARPs. En effet, elle assure à elle seule près de 80 % de l'activité nucléaire de poly(ADP-ribosyl)ation (Ame *et al.*, 2004). PARP-1 est une protéine nucléaire de 1014 acides aminés, d'une masse de 113 kDa (Ame *et al.*, 2004) et active sous forme d'homodimère (Mendoza-Alvarez & Alvarez-Gonzalez, 1993). Bien qu'elle soit abondamment synthétisée dans l'organisme, elle présente cependant, une répartition hétérogène dans les tissus. PARP-1 est ainsi très fortement exprimée dans le cerveau tandis qu'elle est faiblement présente dans les reins (Ogura *et al.*, 1990 ; Pieper *et al.*, 2000).



La structure de la protéine PARP-1 est désormais bien connue (figure 10), cinq de ses six domaines structuraux ont été associés à une fonction particulière :

- le domaine A comporte deux structures en doigt de zinc responsables de son interaction avec le brin d'ADN. Alors que classiquement les doigts de zinc contiennent 12 ou 13 acides aminés et reconnaissent une séquence spécifique d'ADN, ceux de PARP-1 contiennent 28 et 30 acides aminés et ont la capacité de détecter les interruptions sucre-phosphate dans la double hélice de l'ADN (Gradwohl *et al.*, 1990),
- le domaine B contient un signal de localisation nucléaire responsable de la translocation nucléaire de l'enzyme. Il contient également le site de clivage de PARP-1 par les caspases,
- le domaine C contient deux motifs « hélice-boucle-hélice » qui sont généralement impliqués dans les interactions protéine/ADN (Brennan & Matthews, 1989). Un troisième doigt de zinc, récemment mis en évidence entre les acides aminés 233 et 273 (Langelier *et al.*, 2008 ; Tao *et al.*, 2008) ne serait pas responsable de la fixation à l'ADN mais serait nécessaire au fonctionnement de PARP-1,
- le domaine D est un domaine d'auto(ADP-ribosyl)ation comportant un motif BRCT ("breast cancer 1 C terminal") permettant l'interaction avec différents partenaires du noyau (Masson *et al.*, 1998) ainsi qu'un motif "leucine zipper" qui serait responsable de l'homodimérisation de la protéine (Uchida *et al.*, 1993),
- le domaine E contient un motif WGR (tryptophane-glycine-arginine) qui serait responsable d'interaction avec l'ADN mais dont le rôle exact reste à déterminer (Altmeyer *et al.*, 2009),
- le domaine F contient la séquence présentant l'activité catalytique ainsi que le domaine de régulation (Trucco *et al.*, 1999). Ce domaine est la région la plus conservée de la protéine, il est retrouvé chez tous les membres de la famille PARP. Cette séquence comprend notamment un bloc de 50 acides aminés comportant 100 % d'homologie chez tous les vertébrés que l'on appelle la signature PARP (Ruf *et al.*, 1996).

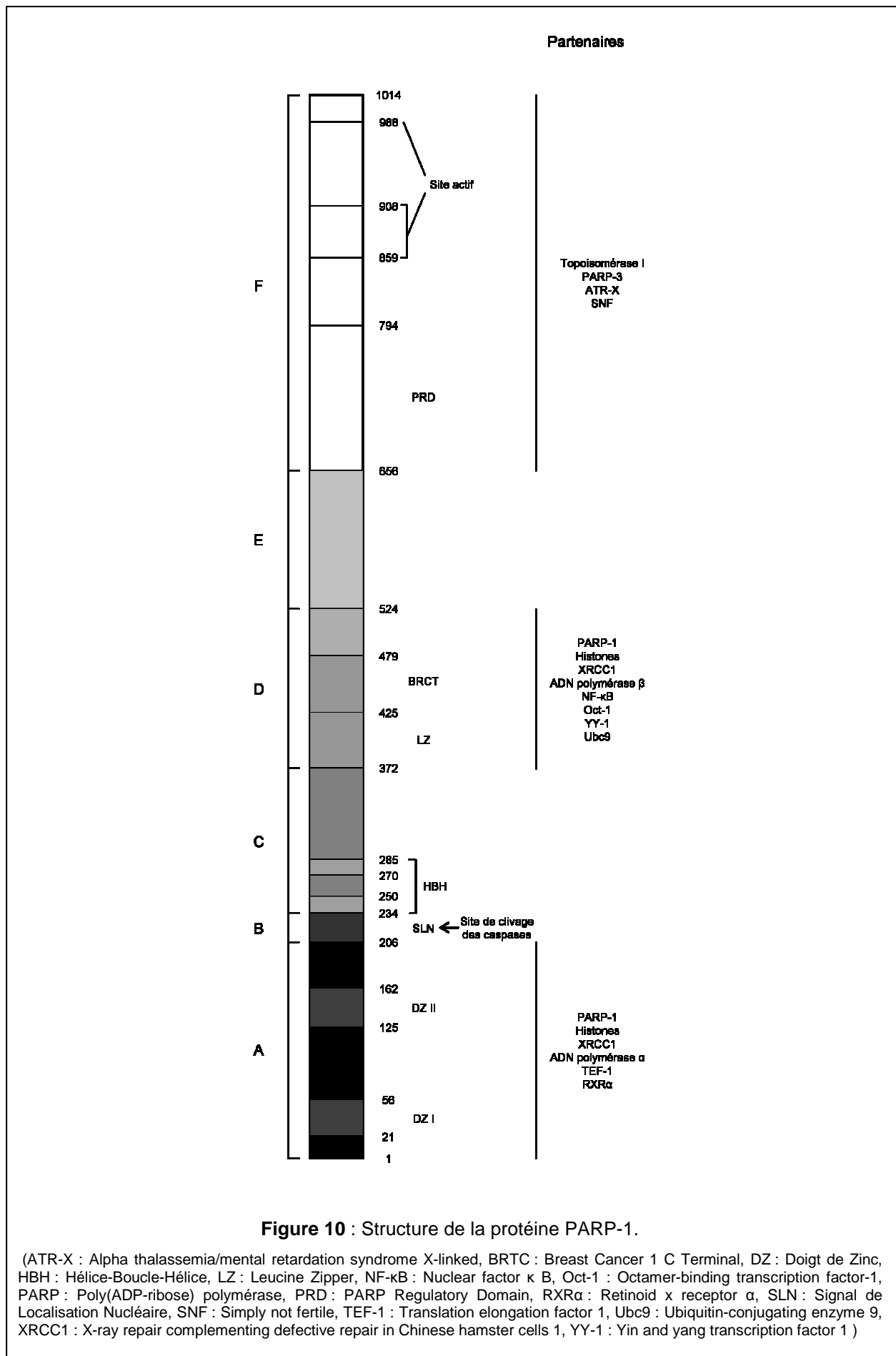


Figure 10 : Structure de la protéine PARP-1.

(ATR-X : Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked, BRTC : Breast Cancer 1 C Terminal, DZ : Doigt de Zinc, HBH : Hélice-Boucle-Hélice, LZ : Leucine Zipper, NF-κB : Nuclear factor κ B, Oct-1 : Octamer-binding transcription factor-1, PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase, PRD : PARP Regulatory Domain, RXRα : Retinoid x receptor α, SLN : Signal de Localisation Nucléaire, SNF : Simply not fertile, TEF-1 : Translation elongation factor 1, Ubc9 : Ubiquitin-conjugating enzyme 9, XRCC1 : X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1, YY-1 : Yin and yang transcription factor 1)

PARP-1 possède à la fois la capacité de fixer un monomère d'ADP-ribose sur la protéine cible, mais également celle d'allonger le polymère et de former des ramifications (Althaus & Richter, 1987). Les PARs produits par PARP-1 sont de longueur très variable : de quelques résidus à près de 200 unités d'ADP-ribose présentant plus ou moins de ramifications (Burkle, 2001). Leurs charges hautement négatives affectent fortement la structure et la fonction des protéines cibles, en particulier leur capacité à interagir avec des molécules anioniques telles que l'ADN. Bien qu'aucun motif spécifique d'acides aminés n'a actuellement été associé à la fixation de PARs sur les protéines cibles, la fixation de ces derniers a été rapportée sur des résidus glutamate (Riquelme *et al.*, 1979), aspartate (Woodhouse & Daniov, 2008) et lysine (Altmeyer *et al.*, 2009). De plus, même si une auto(ADP-ribosyl)ation de PARP-1 impliquée dans la régulation de son activité a été mise en évidence (Ame *et al.*, 2004), les PARs sont essentiellement fixés sur des protéines nucléaires associées à la chromatine (Ame *et al.*, 2004). Enfin, la formation de PARs est un processus dynamique et leur demi-vie dans la cellule est courte (inférieure à 1 min) (Hilz *et al.*, 1981). En effet, ils sont dégradés par 2 enzymes : la poly(ADP-ribose) glycohydrolase et l'ADP-ribose lyase (Jagtap & Szabo, 2005). Dans des conditions normales, l'activité de PARP-1 est faible et le taux de polymères est très bas dans les cellules (Ferro & Oppenheimer, 1978).

Les variations de l'activité de poly(ADP-ribosyl)ation au sein de la cellule ne sont pas liées à une modulation de l'expression du gène codant PARP-1 mais principalement à la régulation de son activité enzymatique. Par exemple, l'auto(ADP-ribosyl)ation de PARP-1 diminue son activité (Jagtap & Szabo, 2005) alors que la présence de calcium l'augmente (Kun *et al.*, 2004). Une des voies de contrôle de son activité passerait par sa phosphorylation au niveau des résidus sérine 372 et thréonine 373 (Kauppinen *et al.*, 2006) par les protéines ERK-2 ("extracellular signal-regulated kinase"), appartenant à la famille des MAPK ("mitogen-activated protein kinase"). Ces voies de régulation contrôleraient l'activation de PARP-1 (Altmeyer & Hottiger, 2009) en réponse à différents stimuli tels que la présence de facteurs de croissance, d'hormones ou lors de dépolarisations (Cohen-Armon, 2007).

B Rôles physiologiques de PARP-1

1) Implication dans la réparation des lésions de l'ADN

La protéine PARP-1 participe au déclenchement de la réparation des cassures simples et doubles brins de l'ADN. Après détection de ces cassures, l'activité de PARP-1 peut être multipliée jusqu'à 500 fois (Benjamin & Gill, 1980), avec une activation maximale pour les

cassures simple brin (Weinfeld *et al.*, 1997). Elle est essentielle à l'activation de la voie BER ("base-excision repair") de réparation des cassures de l'ADN. L'initialisation de la réparation de l'ADN par PARP-1 et la réparation de l'ADN par la voie BER comprennent les étapes suivantes :

- la détection d'une cassure de l'ADN,
- la signalisation du dommage par poly(ADP-ribosyl)ation des histones H1 et H2B, conduisant à un relâchement de la chromatine et une auto(ADP-ribosyl)ation de PARP-1,
- la poly(ADP-ribosyl)ation de XRCC1 ("X-ray cross complementing factor 1") au niveau du site endommagé, ce qui entraîne la formation du complexe SSBR ("single strand breaks repair") qui est le complexe de réparation de l'ADN,
- l'action de la polynucléotide kinase, activée par XRCC1, qui convertit les extrémités de l'ADN en groupement 5'-phosphate et 3'-hydroxyle,
- l'ADN polymérase activée par PARP-1 complète la séquence nucléotidique manquante,
- le brin synthétisé est alors lié par l'ADN ligase III (Jagtap & Szabo, 2005).

2) Rôle dans le cycle cellulaire

La protéine PARP-1 est également suspectée de jouer un rôle au cours de la mitose. En effet, elle serait capable d'interagir avec des protéines responsables de l'organisation de la structure de la cellule et des chromosomes (centrosomes, télomères, centromères et microtubules) (Ame *et al.*, 2004). Elle bloquerait le déclenchement de la mitose lorsque l'ADN est trop endommagé (Schreiber *et al.*, 1995). Elle interagirait également avec un certain nombre de protéines régulant le cycle cellulaire, la prolifération et la différenciation (p53, fos ("FBJ osteosarcoma oncogene"), E2F-1) (D'Amours *et al.*, 1999, Hassa & Hottiger, 2002).

3) PARP-1 et régulation de l'expression génique

La protéine PARP-1 joue un rôle dans la régulation de l'expression génique. En effet, sa capacité à influencer la condensation de la chromatine lui permet de rendre un gène plus ou moins accessible à la machinerie transcriptionnelle (Kraus & Lis, 2003). PARP-1 serait également capable de modifier la composition de la chromatine en excluant l'histone H1 au niveau de certains promoteurs (Krishnakumar *et al.*, 2008). La fixation directe de PARP-1 sur des séquences spécifiques de l'ADN lui permettrait d'influencer la transcription des gènes

voisins de la séquence (CXCL1, BCL6) (Kraus, 2008). De plus, PARP-1, ayant pour cible l'ADN méthyl transférase-1, jouerait un rôle important dans la méthylation de l'ADN et donc dans la régulation de l'expression génique (Reale *et al.*, 2005). Finalement, il a également été montré que la protéine PARP-1 était requise pour l'activité d'un certain nombre de facteurs de transcription tels que HIF-1 α , HES1 ("hairy and enhancer of split 1"), B-myb ("B myeloblastosis oncogene") et NF- κ B (Kraus, 2008). Le rôle de PARP-1 dans l'activation de NF- κ B fera l'objet d'un développement spécifique ultérieur. Finalement, il semble que PARP-1 interviendrait dans la régulation de près de 3,5 % du transcriptome, jouant ainsi un rôle dans de nombreux mécanismes cellulaires (Ogino *et al.*, 2007).

C Rôle de PARP-1 dans la mort cellulaire d'origine ischémique

Au delà de son rôle physiologique de réparation de l'ADN, des études ont, à l'inverse, suggéré que la protéine PARP-1 joue un rôle important dans la mort cellulaire au cours de l'ischémie cérébrale. En effet, le développement de souris KO pour PARP-1 (PARP-1^{-/-}) a révélé de manière inattendue, que ces animaux présentaient une protection importante contre les ischémies cardiaques et cérébrales et contre différents processus inflammatoires (de Murcia *et al.*, 1997 ; Shall & de Murcia, 2000). Deux théories ont été avancées afin d'expliquer l'implication de PARP-1 dans la mort cellulaire.

Tout d'abord, PARP-1 serait indirectement responsable de la mort des cellules exposées à des RL (Berger & Berger, 1986). En réponse aux nombreuses lésions de l'ADN induites par le stress oxydant, PARP-1 se suractive et participe ainsi à l'effondrement des stocks énergétiques de la cellule via une consommation excessive de NAD⁺ (figure 11). Afin de restaurer le stock de NAD⁺ à partir de nicotinamide, la cellule consomme alors de l'ATP et la diminution des réserves énergétiques cellulaires qui en résulte s'accompagne d'une perte du potentiel membranaire et conduit ainsi à la nécrose de la cellule (Jagtap & Szabo, 2005). La consommation par PARP-1 des stocks cellulaires en NAD⁺ est un processus très rapide qui peut prendre moins de 10 min (Wielckens *et al.*, 1982).

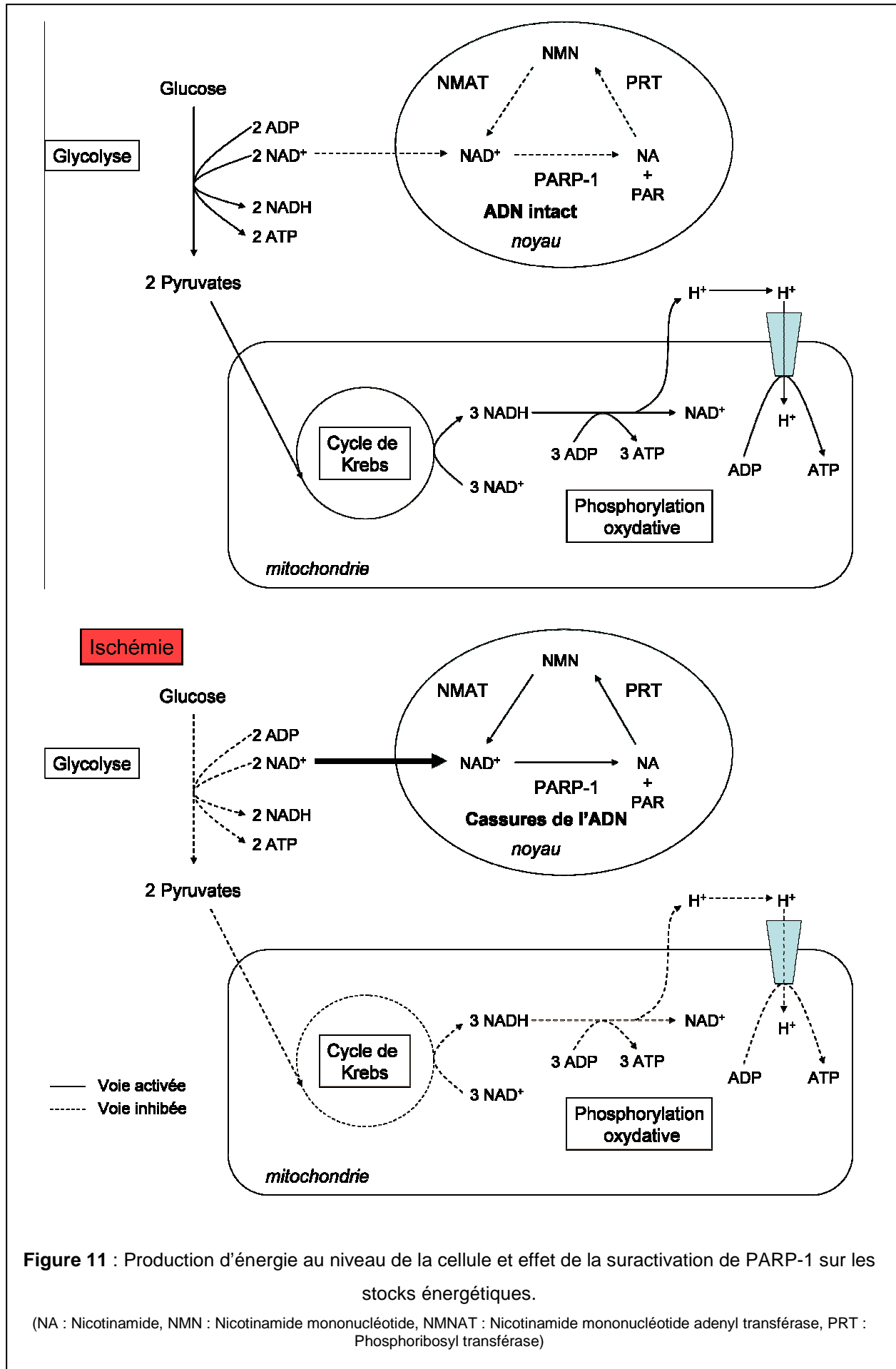


Figure 11 : Production d'énergie au niveau de la cellule et effet de la suractivation de PARP-1 sur les stocks énergétiques.

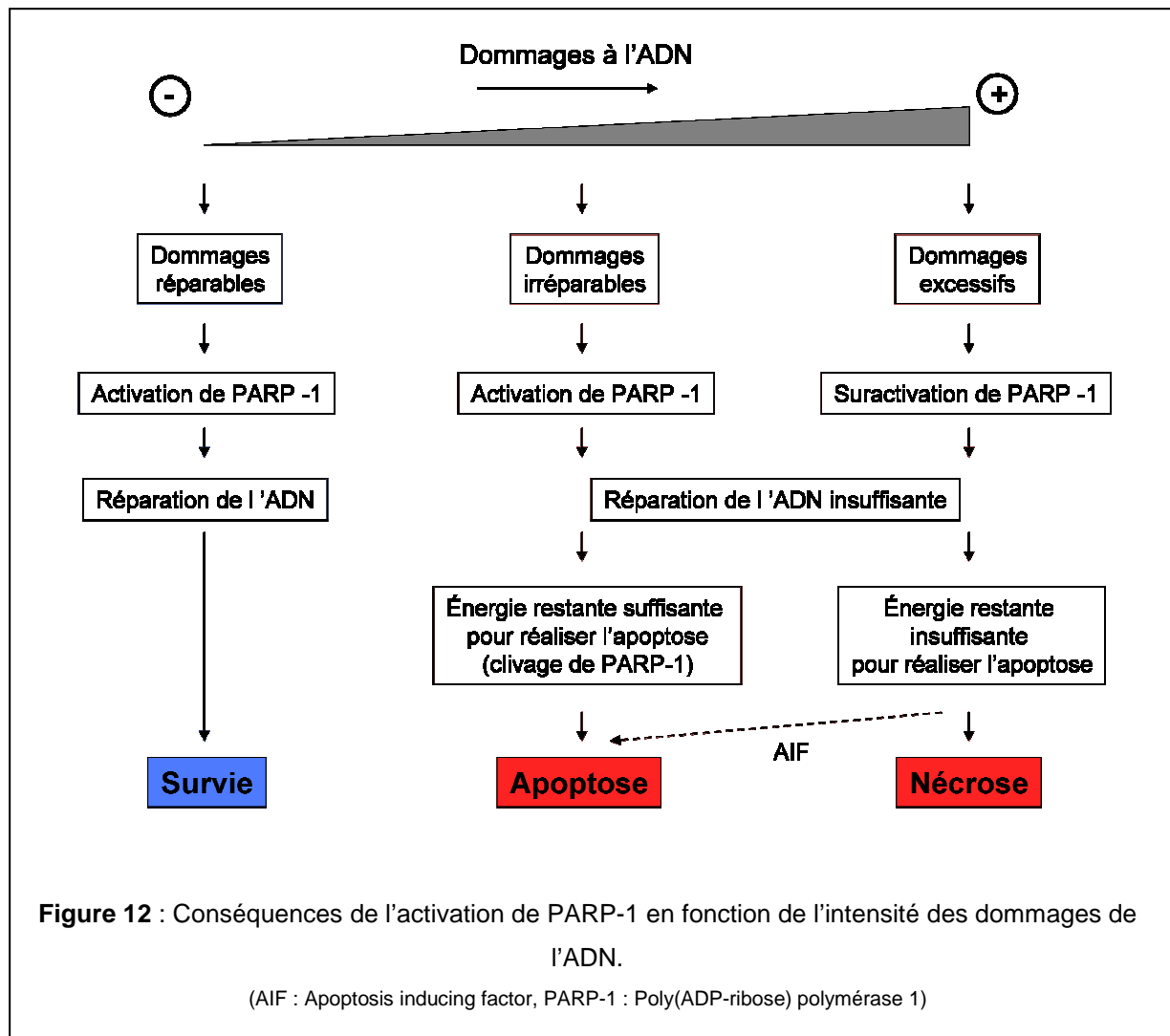
(NA : Nicotinamide, NMN : Nicotinamide mononucléotide, NMNAT : Nicotinamide mononucléotide adenylyl transférase, PRT : Phosphoribosyl transférase)

Une autre théorie plus récente a également proposé une participation directe de PARP-1 dans le processus apoptotique. Les PARs seraient toxiques et agiraient comme un signal de mort cellulaire (Koh *et al.*, 2005). Ils déclencheraient la translocation de l'AIF de la mitochondrie vers le noyau, conduisant à une mort apoptotique caspase-indépendante (Andrabi *et al.*, 2006 ; Yu *et al.*, 2006). L'AIF est une flavoprotéine normalement insérée dans le feuillet externe de la membrane interne de la mitochondrie (Wang *et al.*, 2009) et est indispensable au fonctionnement optimal de la chaîne respiratoire mitochondriale, vraisemblablement via une activité NADH oxydase (Miramar *et al.*, 2001 ; Klein *et al.*, 2002). Cependant, une fois clivé par la calpaïne, l'AIF est transloqué dans le noyau où il provoque une condensation de l'ADN et exerce une activité nucléasique (Cande *et al.*, 2004 ; Vashen *et al.*, 2006). La mort cellulaire se caractérise alors par une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN en morceaux d'environ 50 pb, ainsi qu'une condensation du cytoplasme sans formation de corps apoptotiques et sans activation de la RI (Wang *et al.*, 2009).

Une étude récente (Alano *et al.*, 2010) semble concilier les deux théories en montrant que les deux évènements, déplétion des stocks énergétiques et relargage de l'AIF sont liés. En effet, dans cette étude, les auteurs ont montré que la diminution du stock de NAD⁺ était un élément suffisant et nécessaire au déclenchement de la translocation de l'AIF dans le noyau.

PARP-1 participe également à la mort apoptotique de manière indirecte. En effet, au cours de l'apoptose, les caspases-3, -7 et -8 sont capables de cliver la protéine en deux fragments de 89 et 24 kDa (Ivana Scovassi & Diederich, 2004). Ces protéases reconnaissent le motif DEVD (acide aspartique-acide glutamique-valine-acide aspartique) situé au niveau du signal de localisation nucléaire (Lazebnick *et al.*, 1994). Le clivage conduit à une séparation du domaine de liaison à l'ADN de la partie catalytique, ce qui bloque l'activité de l'enzyme. Des études plus approfondies ont montré que si la protéine PARP-1 n'était pas nécessaire au bon déroulement de l'apoptose, le blocage de son activité semble indispensable à l'exécution des différentes étapes de l'apoptose dont certaines sont énergie-dépendantes (Virag & Szabo, 2002 ; Ivana Scovassi & Diederich, 2004).

Au final, la survie ou la mort de la cellule, ainsi que le type de mort cellulaire induite par l'ischémie semblent fortement dépendants de l'importance de l'activation de PARP-1. Ainsi, l'ampleur des dommages infligés à l'ADN provoque l'activation plus ou moins intense de PARP-1, conduisant à une diminution plus ou moins importante des stocks énergétiques cellulaires (figure 12).



D Rôle de PARP-1 dans le déclenchement de la réponse inflammatoire

Des études réalisées sur les souris PARP-1^{-/-} ont également permis de montrer qu'elles étaient beaucoup moins sensibles au choc septique que les souris sauvages. Ainsi, parmi des souris recevant un traitement aux lipopolysaccharides (LPS), 90 % des souris n'exprimant pas PARP-1 survivent 24 h après injection contre seulement 10 % des souris sauvages (Oliver *et al.*, 1999). Au niveau cérébral, certains travaux ont montré que la microglie des animaux PARP-1^{-/-} produisait très peu de cytokines (Ullrich *et al.*, 2001 ; Chiarugi & Moskowitz, 2003 ; Kauppinen & Swanson, 2005 ; Moroni, 2008) suggérant ainsi que la protéine PARP-1 est capable d'influencer la RI. Son implication dans des pathologies ayant une composante inflammatoire (maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer, méningite, transplantation, diabète) semble confirmer son rôle pro-inflammatoire (Jagtap & Szabo, 2005).

Le rôle de PARP-1 dans le processus inflammatoire se manifesterait via son interaction avec le facteur de transcription NF- κ B qui est à l'origine de l'induction de nombreux gènes impliqués dans la RI (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ (interféron γ), MIP-1 α et 2, P- et E- sélectines, VCAM (molécule d'adhésion cellulaire vasculaire) et ICAM, CD-11 α , iNOS) (Jagtap & Szabo, 2005). L'expression de la plupart de ces gènes est diminuée chez les souris PARP-1^{-/-} (Hassa & Hottiger, 2002). Le mécanisme exact par lequel PARP-1 interagit avec NF- κ B reste à élucider. Les expériences menées par Oliver *et al.* (1999) ont cependant montré que ni la dégradation de I κ B- α ("inhibitor of κ B"), le plus fréquent des inhibiteurs de NF- κ B, ni la translocation de NF- κ B n'était affectée dans les cellules PARP-1^{-/-}. L'action de PARP-1 sur NF- κ B aurait donc lieu dans le noyau. Plusieurs études suggèrent que l'activité de PARP-1 est nécessaire à l'activation de NF- κ B (Nakajima *et al.*, 2004 ; Kauppinen & Swanson, 2005) alors que d'autres ont montré au contraire, que l'activation de la transcription des gènes cibles de NF- κ B était indépendante de l'activation de PARP-1 (Hassa *et al.*, 2001 ; Petrilli *et al.*, 2004). Ainsi, Hassa *et al.* (2001) ont mis en évidence que l'inhibition de PARP-1 n'était pas associée à une diminution de l'expression d'un gène rapporteur induite par le LPS ou le TNF- α . Au contraire, Kauppinen & Swanson (2005) ont observé que les cellules microgliales en cultures primaires traitées au DPQ (3,4-dihydro-5[4-(1-piperinedinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinoline), un inhibiteur de PARP-1, présentaient à la fois une diminution de leur activation et de la synthèse de MMP-9 en réponse à un traitement au TNF- α . Ces résultats contradictoires ne permettent pas de conclure mais, quoiqu'il en soit, il semble que l'activation de NF- κ B par la protéine PARP-1 passe par une interaction entre les deux protéines (Chang & Alvaro-Gonzalez, 2001). Une autre hypothèse serait que le contact entre PARP-1 et NF- κ B ait lieu via une troisième protéine, par exemple via la protéine de haute mobilité du groupe-1 (HMG-1) qui est à la fois un coactivateur de NF- κ B et une protéine cible de PARP-1 (Oliver *et al.*, 1999).

Il est également probable que la participation de PARP-1 au déclenchement de la RI ne se limite pas uniquement à l'activation de NF- κ B. En effet, PARP-1 est également capable d'interagir avec le facteur AP-1 qui joue aussi un rôle essentiel dans la RI. Ainsi, il a été montré que l'activation d'iNOS dépendait à la fois de NF- κ B et d'AP-1 (Cho *et al.*, 2005). De plus, cet argument est supporté par le fait que l'activité de transcription d'AP-1 est abolie lors de l'inhibition de PARP-1 (Kaplan *et al.*, 2005 ; Martin-Oliva *et al.*, 2006). De plus, plusieurs études ont également montré que PARP-1 est capable de poly(ADP-ribosyl)er de nombreux autres facteurs de transcription (AP-1, AP-2, TEF-1 ("translation elongation factor 1"), SP-1 ("specificity protein 1"), Oct-1 ("octamer-binding transcription factor-1"), Stat-1 ("signal

transducer and activator of transcription 1"), YY-1 ("yin and yang transcription factor 1")) jouant là encore un rôle dans la RI (Jagtap & Szabo, 2005).

III Microglie

A Introduction

Les cellules microgliales constituent une population unique de cellules immunitaires du SNC. Considérées comme les macrophages résidents du cerveau, ces cellules présentent cependant un certain nombre de spécificités les distinguant des autres populations de macrophages. Une de ces spécificités est leur morphologie étoilée permettant aux cellules microgliales, par le biais de prolongements toujours en mouvements, de sonder en permanence l'ensemble du parenchyme cérébral.

Initialement découvertes en 1919 par Del Rio Hortega, il aura fallu attendre plusieurs dizaines d'années pour que les cellules gliales et la microglie, en particulier, soient étudiées. Il a ainsi été rapporté que les cellules microgliales représentent 10 à 20 % des cellules du SNC (Raivich *et al.*, 1999) avec de fortes variations en fonction de la région cérébrale étudiée. Ainsi, des régions telles que l'hippocampe, le bulbe olfactif, les ganglions de la base et la *substantia nigra* sont riches en cellules microgliales alors que des régions telles que le cervelet et le tronc cérébral n'en possèdent que peu (Lawson *et al.*, 1993).

Au delà de ces variations en terme de densité cellulaire, il a également été mis en évidence des disparités de morphologie et de phénotype en fonction des territoires. Cette hétérogénéité dans la/les population(s) de microglie ainsi que l'absence de marqueurs spécifiques permettant leur discrimination précise expliquent en partie les difficultés rencontrées par la communauté scientifique dans la caractérisation de ces cellules. A cet égard, en dépit de plus de 10 000 articles publiés au cours de ces 20 dernières années et d'un gain de connaissances important concernant le fonctionnement de la microglie, leur(s) origine(s) et leur implication dans des pathologies telles que l'AVC ischémique et les maladies neurodégénératives font toujours l'objet d'intenses controverses.

B Les origines de la microglie

1) Formation des cellules microgliales au cours du développement

Parmi les hypothèses avancées quant à l'origine des cellules microgliales, la piste mésodermale semble prépondérante.

Del Rio Hortega fut le premier à postuler l'origine mésodermale des cellules microgliales. En 1932, il mit en évidence des régions cérébrales, qu'il nomma « fontaine à microglie », comme étant à l'origine de cellules microgliales qui coloniseraient par la suite l'ensemble du SNC. Les cellules microgliales nouvellement formées présenteraient dans un premier temps une morphologie amiboïde puis adopteraient une forme ramifiée une fois leur migration terminée (Kershman *et al.*, 1939). Au niveau cérébral, la présence de cellules Mac1⁺ ("macrophage 1 antigène", récepteur du complément C3 ou CD11b) ayant une capacité de prolifération importante et générant des cellules filles dont certaines présentent des marqueurs similaires à ceux de la microglie a été rapportée (Alliot *et al.*, 1991). De même, plusieurs études utilisant un marquage de la lectine IB4, un marqueur des cellules microgliales et des cellules endothéliales, ont montré que chez la Souris, la colonisation du cerveau par les cellules microgliales était indépendante de la vascularisation des tissus et semblait être issue de précurseurs originaires du sac vitellin (Alliot *et al.*, 1999 ; Kaur *et al.*, 2001).

Certaines études ont également suggéré une origine neuroectodermale des cellules microgliales (Rydberg 1932 ; Paterson *et al.*, 1973). Selon cette théorie, les cellules microgliales dériveraient de microglioblastes issus du neuroectoderme (Fujita *et al.*, 1981). En effet, des injections de ³H-thymidine dans les ventricules de jeunes rats ont conduit à un marquage de plus de 90 % des cellules gliales de l'hippocampe (astrocytes et microglie), montrant ainsi l'apparition tardive de ces cellules au sein de cette structure. De plus, cette prolifération est associée à un changement de morphologie des glioblastes, qui sont les cellules précurseurs des astrocytes et sont suspectés de donner naissance à la microglie (Paterson *et al.*, 1973 ; Kitamura *et al.*, 1984). D'autres études ont également révélé la présence de marqueurs communs entre les cellules microgliales et les cellules neuro-épithéliales, ce qui semble suggérer l'existence de précurseurs communs à l'ensemble des cellules gliales (microglie, astrocytes, oligodendrocytes) (Wolzwikj *et al.*, 1995 ; Fedoroff *et al.*, 1997). Finalement, Hao *et al.* (1991) et Richardson *et al.* (1993) ont obtenu *in vitro* des cellules microgliales à partir de culture de neuro-épithélium embryonnaire. Ainsi, la mise en culture du neuro-épithélium d'embryons de souris (entre 8 et 9 j de gestation) conduit à

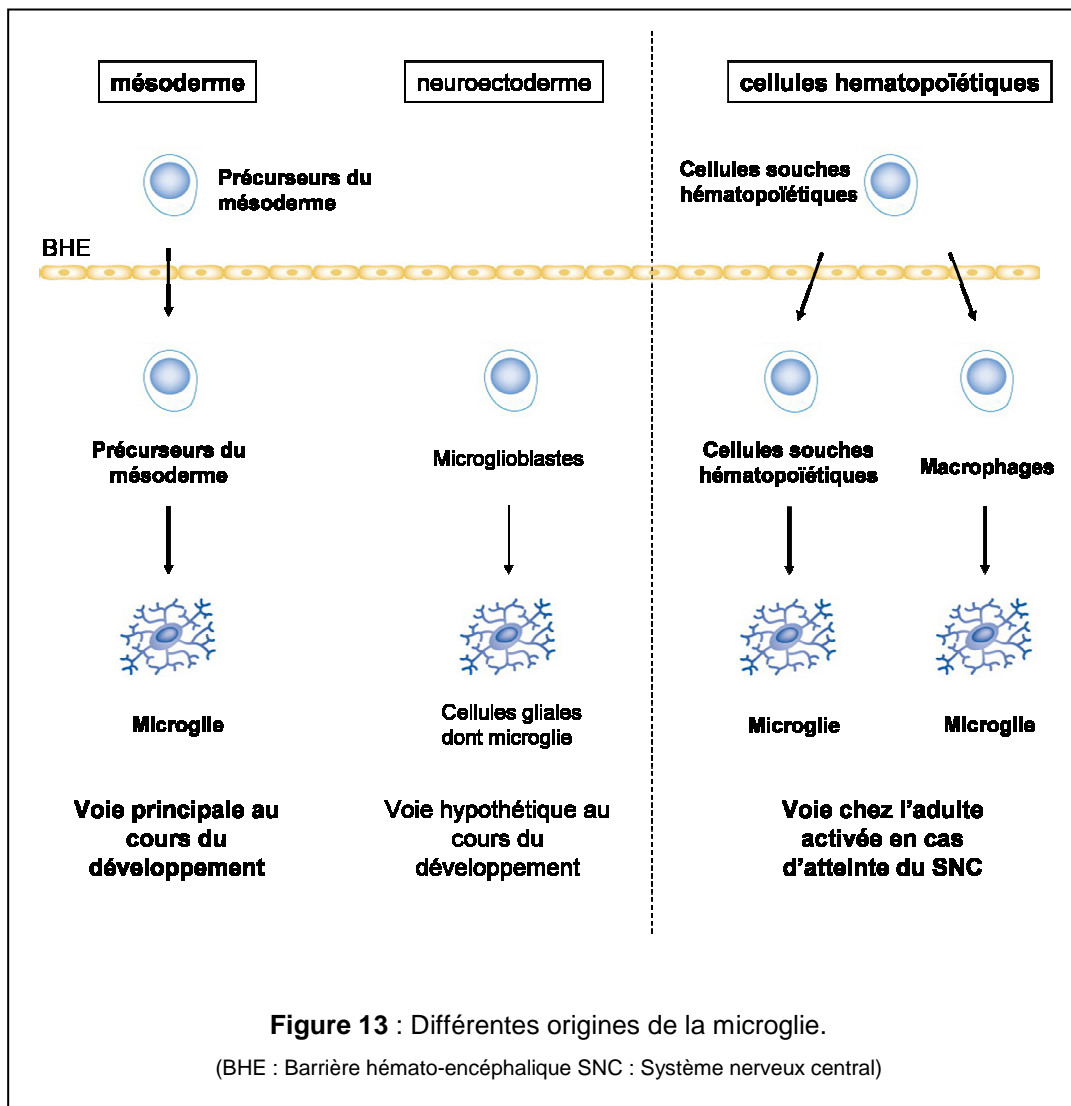
l'apparition de cellules Mac-1⁺ et GFAP⁺ présentant une morphologie correspondant à celle de la microglie. Cependant, malgré ces résultats intéressants, les travaux montrant une origine neuroectodermale des cellules microgliales restent marginaux.

2) Renouvellement hématopoïétique des cellules microgliales

Au-delà de leur origine mésodermale, lors d'atteintes du SNC, il semblerait qu'une partie des cellules microgliales soient issues des cellules de la moelle osseuse, dont l'appellation anglo-saxonne est "bone marrow derived-microglia" (BMDM) (Davoust *et al.*, 2008). En effet, par la réalisation d'une greffe de cellules de moelle d'animaux exprimant constitutivement la GFP ("green fluorescent protein") à des animaux irradiés a montré que ces animaux présentaient des cellules capables d'infiltrer le parenchyme cérébral et de se différencier en cellules microgliales. Au bout de 3 mois, 5 % des cellules microgliales expriment la GFP dans l'ensemble du cerveau et près de 26 % au niveau du cervelet (Priller *et al.*, 2001 ; Djukic *et al.*, 2006). De plus, Davoust *et al.* (2006) ont isolé dans le cerveau de souris une population de cellules progénitrices myéloïdes capables de se différencier *in vitro* en cellules microgliales dans un modèle d'encéphalomyélite. Ces cellules exprimant le marqueur CD34, un marqueur habituellement associé aux cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, ont été découvertes dans le cerveau de souriceaux nouveaux-nés et une fraction de ces cellules exprime également le marqueur CD11b. De plus, elles sont capables de donner naissance à des cellules semblables à de la microglie lorsqu'elles sont cultivées *in vitro* dans un milieu contenant du M-CSF ("macrophage colony-stimulating factor") alors que les cellules progénitrices CD34⁻ de la moelle osseuse en sont incapables. Cependant, si la présence des BMDM a bien été caractérisée dans le cas d'une altération du SNC, l'existence de ce renouvellement dans le cerveau sain reste à prouver. En effet, il a été montré que l'irradiation utilisée dans les modèles de greffe de moelle osseuse GFP⁺ était à l'origine d'une altération de la BHE autorisant l'infiltration des cellules circulantes dans le parenchyme cérébral. Ainsi, dans ces modèles, la protection de la tête contre les irradiations conduit alors à une absence de cellules marquées au sein du cerveau (Mildner *et al.*, 2007).

L'ensemble de ces données expérimentales suggère qu'au cours du développement les cellules microgliales colonisant la totalité du SNC dériveraient de précurseurs mésodermaux ou neuroectodermaux. Une fois installées au sein du SNC, ces cellules constitueraient dès lors un groupe cellulaire extrêmement stable numériquement parlant, n'étant renforcé qu'en cas d'atteintes du SNC par l'apport de cellules issues de l'hématopoïèse (Lassmann *et al.*, 1993 ;

Tambuyzer *et al.*, 2009) (figure 13). Cependant, certaines études proposent que le phénotype de ces BMDM diffère de celui des cellules microgliales résidentes. Par exemple, le marqueur CD11c est présent à la surface des BMDM alors qu'il est absent sur les cellules microgliales résidentes (Simard & Rivest, 2004). Les BMDM exprimeraient également plus fortement les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II lors de leur activation (Kaneko *et al.*, 2008). Ces observations semblent évoquer une activité de présentation d'antigènes plus grande chez les BMDM que chez les cellules microgliales résidentes (Davoust *et al.*, 2008).



C Hétérogénéité de la microglie

1) La microglie au cours du développement du SNC

Même si l'origine des cellules microgliales n'est pas clairement déterminée, l'apparition et la distribution de la microglie au cours du développement ont été bien caractérisées chez l'Homme (Monier *et al.*, 2007). Les premières cellules microgliales apparaissent au niveau des méninges et des plexus choroïdes proches de la fissure di-télecephalique au bout de 5 semaines et demi de gestation. Par la suite, des amas de cellules microgliales se forment dans le diencéphale au niveau des jonctions de la capsule interne avec les projections thalamiques, la capsule externe et les pédoncules cérébraux (entre 10 et 16 semaines de gestation). Au cours du développement, les cellules microgliales présentent tout d'abord une morphologie amiboïde puis adoptent progressivement une structure ramifiée (Ling & Wong, 1993). Lors du second semestre, les cellules microgliales colonisent la totalité du parenchyme cérébral et commencent à présenter une morphologie ramifiée.

La microglie fœtale aurait une influence sur la croissance et la survie neuronale (Rabchevsky & Streit, 1997 ; Marin-Teva *et al.*, 2004) ainsi que sur l'angiogenèse (Streit, 2001) et participerait ainsi à la formation du tissu nerveux. En effet, les cellules microgliales induiraient la mort cellulaire par apoptose nécessaire à l'élaboration de réseaux neuronaux complexes, via le relargage de NGF, TNF- α , FasL et IL-1 β (Bessis *et al.*, 2007 ; Streit & Xue, 2009). Elles seraient également impliquées dans le guidage des axones et dans la formation/résorption des projections neuronales en synthétisant des neurotrophines telles que BDNF, GDNF ("glial cell line derived neurotrophic factor"), IGF-1, NGF et NT-3 (neurotrophine 3) (Milligan *et al.*, 1991 ; Batchelor *et al.*, 2002 ; Pollard, 2009). Finalement, la microglie fœtale pourrait également jouer un rôle dans la plasticité synaptique en particulier via KARAP/DAP12 ("KAR associated protein/DNAX activator protein 12") qui influence l'activité des synapses (Bessis *et al.*, 2007 ; Wake *et al.*, 2009). Les cellules microgliales fœtales présentent un certain nombre de différences phénotypiques et fonctionnelles avec les cellules microgliales adultes. Ainsi, en raison d'une plus grande activité de phagocytose et d'un spectre plus large de signaux activateurs, elles expriment aussi à leur surface des récepteurs au LDL ("low-density lipoprotein") et des récepteurs de type scavenger (Giulian & Baker, 1986 ; Husemann *et al.*, 2002).

2) La microglie dans le SNC adulte sain

A l'âge adulte, les cellules microgliales présentent au repos une morphologie ramifiée avec de nombreux prolongements qui sondent continuellement le milieu environnant. Les cellules microgliales en conditions physiologiques sont abusivement appelées quiescentes, alors qu'elles sont loin d'être inactives. En effet, elles sont impliquées dans de nombreux mécanismes physiologiques tels que la surveillance du SNC, le déclenchement de la RI, l'homéostasie, l'élimination des débris cellulaires et la neuroplasticité... (Aloisi, 2001). Ces cellules peuvent être activées à la moindre perturbation détectée dans le parenchyme cérébral (Ladeby, *et al.*, 2005).

La microglie joue un rôle prépondérant dans le système immunitaire au niveau du SNC, un organe spécifique du point de vue immunitaire qui se caractérise par la BHE maintenant les leucocytes hors du SNC, ainsi que par un faible drainage lymphatique via les espaces de Virchow-Robin et une faible expression de CMH (Streit *et al.*, 1999). Dans ce contexte, la microglie sert de cellule de surveillance chargée de détecter et de s'activer en réponse à toute anomalie au niveau du SNC (Kreutzberg, 1996). Des études de mobilité des ramifications de la microglie ont permis d'estimer que la totalité du SNC était contrôlée en quelques heures (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Les cellules microgliales sont aussi des cellules présentatrices d'antigènes, une partie d'entre elles exprimant des molécules du CMH, celles du CMH de classe I étant plus fortement exprimées que celles de classe II (Matsumoto & Fujirawa, 1987 ; Streit *et al.*, 1989). Cependant, ce rôle semble mineur et l'essentiel de l'activité de présentation d'antigènes au sein du SNC dépend des cellules périvasculaires (Ford *et al.*, 1995).

Au delà de leur fonction de surveillance et de défense, elles possèdent également un rôle dans la réparation du SNC et seraient impliquées dans le maintien de l'homéostasie cérébrale (Aloisi, 2001). Ainsi, les cellules microgliales exercent un effet neuroprotecteur en capturant le glutamate et le fer présents dans le milieu extracellulaire (Streit & Xue, 2009). Elles interviendraient dans le fonctionnement synaptique et pourraient par ce biais influencer la transmission de l'information. Il a ainsi été montré que les cellules microgliales interagissaient avec les synapses de façon proportionnelle à leur activité et que ces interactions pouvaient conduire à la suppression de certaines synapses (Wake *et al.*, 2009). Les cellules microgliales joueraient donc un rôle d' "électricien" au sein du SNC en veillant au fonctionnement des synapses et en contrôlant la synaptogenèse (Greaber, 2010).

3) La microglie dans le SNC sénescence

La microglie sénescence présente un phénotype et une morphologie altérés qui correspondent à la microglie dite "dystrophique" (Streit, 2006). Cette microglie tend à prendre un phénotype activé et une morphologie de plus en plus hypertrophiée chez les personnes âgées (Streit *et al.*, 1999). Elle possède également moins de ramifications et son stade ultime de vieillissement est la fragmentation du cytoplasme déclenchant la mort cellulaire (Streit *et al.*, 2009). Ces changements morphologiques s'accompagnent d'une expression plus importante de marqueurs de l'activation microgliale : CMH de classe II, ICAM et CD86 (Lynch, 2009). De plus, la microglie dystrophique présente une RI altérée, avec une augmentation de la synthèse de composés pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) et une diminution de la synthèse de composés anti-inflammatoires (TGF- β , IL-10) (von Bernhardi *et al.*, 2010). De plus, des travaux rapportent que les cellules microgliales sénescence pourraient jouer un rôle dans le déclenchement des maladies neurodégénératives. D'une part, elles participeraient à la formation de plaques séniles en s'associant en groupes d'au moins trois cellules (Streit & Sparks, 1997). D'autre part, il existerait une relation entre la sénescence de la microglie et l'apparition de pathologies liées à la protéine tau (Streit *et al.*, 2009). Finalement, deux hypothèses sur l'implication de la microglie dans le développement des maladies neurodégénératives ont été récemment proposées (Polazzi & Monti, 2010). La première postule un rôle actif de la microglie sénescence dans le déclenchement de ces maladies ; leur activation pathologique s'accompagnerait d'une synthèse prépondérante de composés cytotoxiques à l'origine de la dégénérescence des neurones. A l'opposé, la seconde hypothèse suppose un rôle passif de la microglie qui par un arrêt de la synthèse de composés neurotrophiques rendrait les neurones plus sensibles aux agressions extérieures (Polazzi & Monti, 2010).

D Activation de la microglie

Une des principales caractéristiques des cellules microgliales est leur capacité à s'activer très rapidement en réponse à différents stimuli (Rock *et al.*, 2004), que ce soit lors d'infections bactériennes ou virales (Olson *et al.*, 2001), d'ischémie cérébrale (Stoll *et al.*, 1998), de sections de nerfs, de lésions excitotoxiques ou de maladies dégénératives (Ransohoff & Perry, 2009). Lors d'une lésion aiguë du SNC, l'activation microgliale se traduit sur le plan cellulaire par des modifications morphologiques et sur le plan moléculaire

par des changements dans l'éventail des molécules exprimées à la surface des cellules et dans le panel des cytokines et des facteurs de croissance produits.

1) Les voies d'activation

L'activation rapide de la microglie est causée soit par une activation directe des récepteurs de l'immunité innée, soit par une activation indirecte par des cytokines pro-inflammatoires ou encore par la détection d'un dysfonctionnement neuronal (Yenari *et al.*, 2010). La diversité des récepteurs exprimés par la microglie explique le grand nombre de stimuli susceptibles d'activer la microglie (figure 14). En effet, ces cellules expriment :

- les récepteurs d'épuration (scavenger receptor) permettant la reconnaissance et l'élimination de substances toxiques ainsi que des cellules apoptotiques et des bactéries (Mukhopadhyay & Gordon, 2004),
- les récepteurs de la famille Toll (TLR) capables de reconnaître les bactéries, les virus, les parasites et les champignons (Pasare & Medzhitov, 2004),
- les récepteurs du complément constituant un des systèmes d'élimination des pathogènes de l'immunité innée (Rotshenker *et al.*, 2003),
- les récepteurs aux neurotransmetteurs, en particulier le glutamate (Farber *et al.*, 2005),
- les récepteurs purinergiques permettant la détection de la présence d'ATP dans le milieu extracellulaire (Inoue *et al.*, 2002),
- un large éventail de récepteurs pour des cytokines (IFN- γ , TNF- α), des chemokines (fractalkine) et des facteurs de croissance (M-CSF, GM-CSF ("granulocyte-macrophage colony-stimulating factor")) (Yenari *et al.*, 2010),
- le récepteur TREM2 ("triggering receptor expressed on myeloid cells 2") récemment mis en évidence comme étant capable de reconnaître la protéine HSP60 ("heat shock protein") et de conduire à une activité de phagocytose chez les cellules microgliales (Yenari *et al.*, 2010).

Trois voies principales de transduction peuvent être mises en jeu : la voie SAPK/JNK ("stress activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase"), la voie p38 MAPK et la voie ERK. Les principaux facteurs de transcription intervenant dans l'activation des cellules microgliales sont NF- κ B et AP-1 qui contrôlent l'expression de nombreux gènes impliqués dans la RI. Un certain nombre de facteurs ont pour effet d'inhiber l'activation microgliale (PPAR γ ("peroxisome proliferator-activated receptor"), HSP70, glucocorticoïdes) en limitant

l'activation de NF- κ B (Yenari *et al.*, 2010). Une étude récente (Burguillos *et al.*, 2011) a fait ressortir le rôle des caspases dans l'activation microgliale. En effet, la fixation de LPS sur le récepteur TLR-4 s'accompagnerait du recrutement de la caspase-8 qui activerait les caspases effectrices 3 et 7. Cependant, l'activation de ces caspases n'entraîne pas l'apoptose des cellules microgliales, mais déclenche la synthèse de nombreux composés pro-inflammatoires (NO, RL, IL-1 β , IL-5, IL-2, IFN- γ). Les caspases 3 et 7 activeraient la protéine kinase PKC- γ qui permet la libération de NF- κ B en phosphorylant IKK ("I κ B kinase") qui à son tour phosphoryle I κ B, ce qui conduit à la translocation nucléaire de NF- κ B.

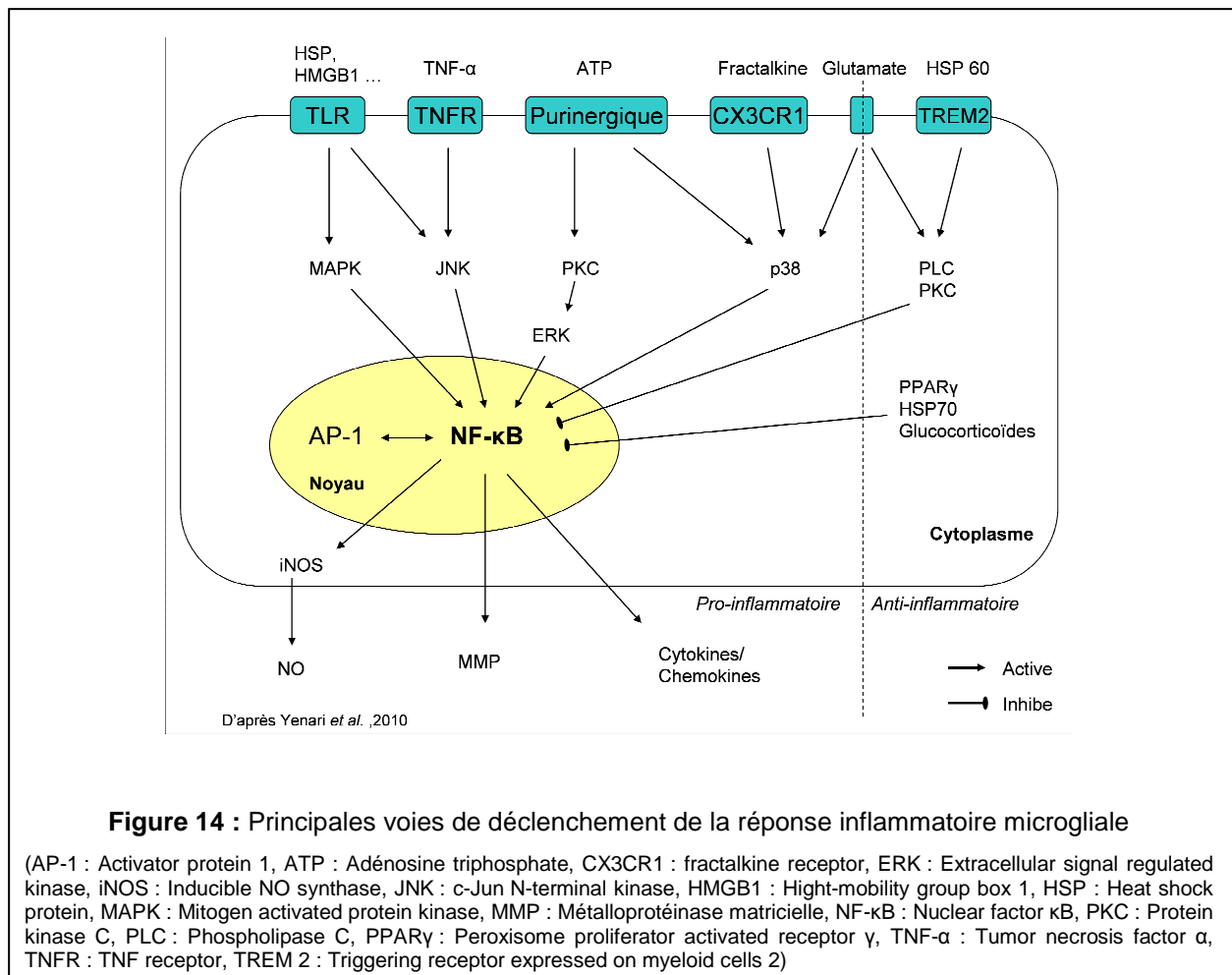


Figure 14 : Principales voies de déclenchement de la réponse inflammatoire microgliale

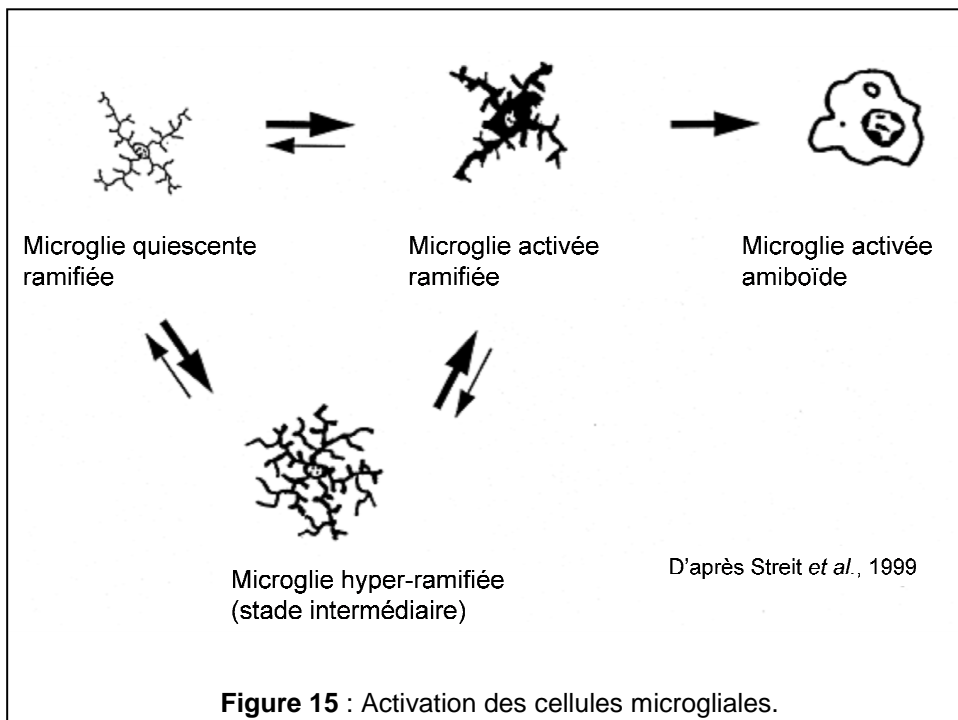
(AP-1 : Activator protein 1, ATP : Adénosine triphosphate, CX3CR1 : fractalkine receptor, ERK : Extracellular signal regulated kinase, iNOS : Inducible NO synthase, JNK : c-Jun N-terminal kinase, HMGB1 : High-mobility group box 1, HSP : Heat shock protein, MAPK : Mitogen activated protein kinase, MMP : Métalloprotéinase matricielle, NF- κ B : Nuclear factor κ B, PKC : Protein kinase C, PLC : Phospholipase C, PPAR γ : Peroxisome proliferator activated receptor γ , TNF- α : Tumor necrosis factor α , TNFR : TNF receptor, TREM 2 : Triggering receptor expressed on myeloid cells 2)

2) Plasticité fonctionnelle de la microglie

Comme indiqué dans l'Introduction, l'activation de la microglie s'accompagne de nombreux changements phénotypiques et morphologiques adaptés conférant une grande plasticité fonctionnelle aux cellules microgliales : la présentation d'antigènes, le relargage de chémokines favorisant le chimiotactisme, la rétractation de ses prolongements, la migration

en direction du site inflammatoire, le relargage de cytokines, de MMP, de RL et le passage à une morphologie amiboïde associée à une activité de phagocytose (Chan *et al.*, 2007 ; Lynch, 2009).

Les changements morphologiques observés lors de l'activation microgliale comportent différents stades qui dépendent de la nature des signaux activateurs reçus (figure 15). Le premier stade correspond à la microglie hyper-ramifiée qui est un stade intermédiaire d'activation pouvant être induit par une lésion de faible intensité et qui entraîne le commencement de l'hypertrophie microgliale (Streit *et al.*, 1999). Cet état est également observé au cours de pathologies dégénératives discrètes ou lors du vieillissement cérébral. Dans un deuxième temps, lors de dommages neuronaux plus importants ne s'accompagnant cependant pas de mort cellulaire, la microglie va s'activer tout en conservant une morphologie ramifiée. Finalement, la mort neuronale déclenche des changements morphologiques irréversibles des cellules microgliales qui vont prendre une forme amiboïde associée à une activité de phagocytose (Raivich *et al.*, 1999). Les cellules microgliales présenteraient cependant une activité de phagocytose moindre que les macrophages (Simard *et al.*, 2006a). Contrairement aux cellules microgliales amiboïdes, les cellules hyper-ramifiées et activées ramifiées sont capables de retourner au stade quiescent une fois de retour à une situation normale.



Les changements morphologiques observés lors de l'activation microgliale s'accompagnent de modifications importantes de l'expression de nombreux facteurs intervenant dans la RI (cytokines : TNF- α , IL-1 β , IL-6 ; chémokines : MCP-1, MIP-1 α ; Mac1...) ainsi que de facteurs trophiques (BDNF, IGF-1, GDNF ...) (Lynch, 2009 ; Polazzi & Monti, 2010). Un certain nombre de marqueurs ont ainsi été associés à l'activation des cellules microgliales : CMH II et CD86 qui permettent la présentation d'antigènes, CD11b (récepteur du complément de type 3) et CD40 (récepteur du TNF) qui contribuent à la propagation de la RI, ICAM qui favorise le recrutement des leucocytes et enfin Iba1 qui participe au mécanisme de phagocytose.

3) Activation en réponse à une ischémie cérébrale

Alors que la cinétique d'activation des cellules microgliales en réponse à une ischémie cérébrale est très bien caractérisée, les conséquences de cette activation restent un sujet de controverses. En effet, l'inflammation au niveau cérébral a longtemps été considérée comme délétère et à ce titre, l'activation des cellules microgliales a été considérée comme néfaste. Cependant, un certain nombre d'observations sont venues nuancer cette vision et des effets bénéfiques ont également été associés à cette activation microgliale (Schwartz *et al.*, 2006 ; Polazzi *et al.*, 2010).

a/ Cinétique d'activation

En raison de leur rôle d'immunosurveillance du SNC, les cellules microgliales sont très rapidement activées en réponse à une ischémie cérébrale. Il a ainsi été observé une activation de la microglie seulement quelques minutes après la survenue d'une ischémie obtenue par occlusion transitoire de l'ACM (Abraham *et al.*, 2003). Les cellules microgliales se multiplient rapidement, avec un pic entre 48 h et 72 h post-ictus, la prolifération pouvant se prolonger pendant plusieurs semaines (Denes *et al.*, 2007). L'accumulation de débris cellulaires dans le milieu extracellulaire constitue un des facteurs déclenchant les changements morphologiques et l'activité de phagocytose des cellules microgliales. En effet, l'élimination de l'ensemble des débris cellulaires est nécessaire à l'initialisation des processus de réparation (Stoll *et al.*, 2004). Les cellules microgliales présentent chez la Souris une activité de phagocytose dès le premier jour suivant une occlusion transitoire de l'ACM et cette activité s'étend jusqu'à 14 j après sa survenue. Cependant, l'activité de phagocytose est maximale dans les quatre premiers jours suivant l'induction de l'ischémie (Schilling *et al.*, 2005).

Dans le cas d'une ischémie globale transitoire obtenue par occlusion des quatre vaisseaux chez le Rat ou par occlusion des deux carotides chez la Gerbille, on observe également une activation rapide de la microglie (Morioka *et al.*, 1991 ; Moon *et al.*, 2009). Cette activation, induite en moins de 20 min, étant observable jusqu'à un mois, est maximale aux jours 4 et 6. Il faut cependant signaler que si l'activation microgliale concerne l'ensemble du parenchyme cérébral dans un premier temps, elle se concentre au niveau des zones de mort neuronale (couche CA₁ de l'hippocampe) aux temps les plus longs (Stoll *et al.*, 1998).

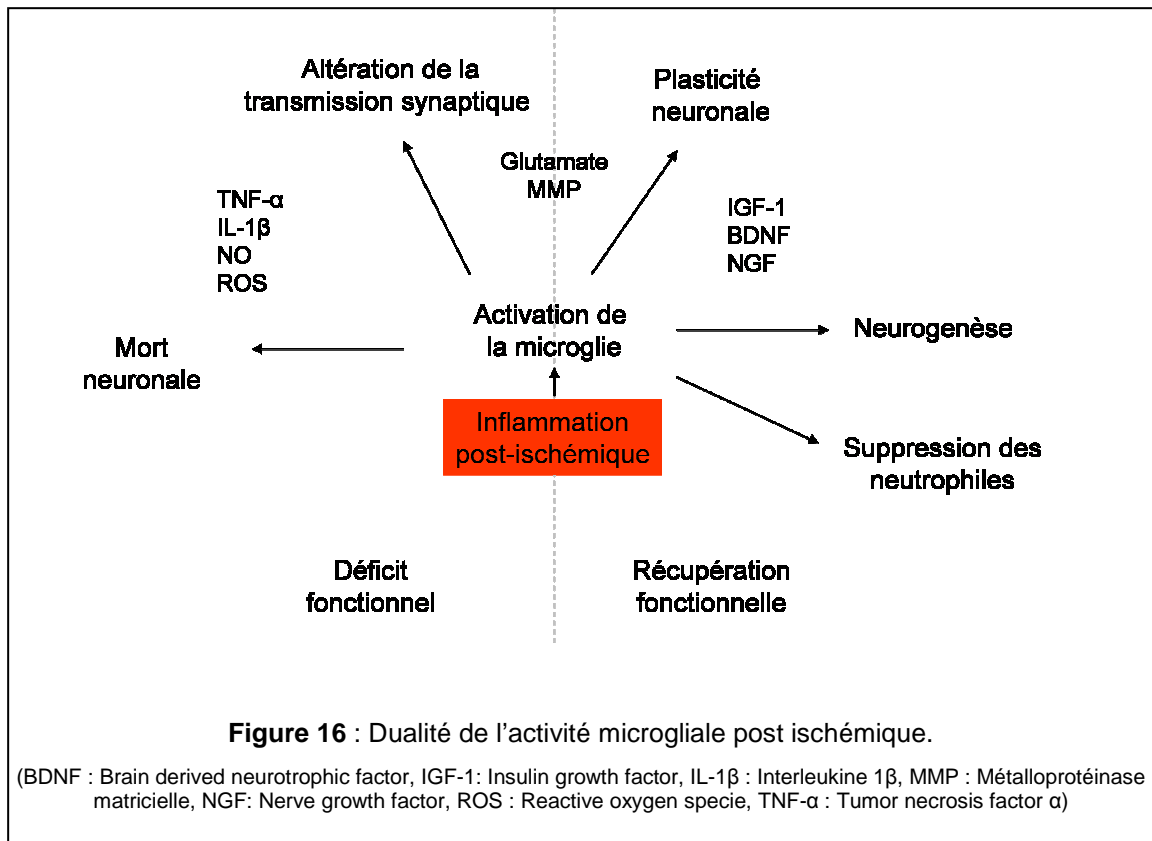
b/ Rôle délétère et rôle bénéfique des cellules microgliales

Historiquement, la RI associée à une ischémie cérébrale a été considérée comme délétère. Après l'induction d'une ischémie, les cellules microgliales vont augmenter l'expression de protéines immunologiques membranaires telles que les CMH I et II, ainsi que le récepteur au complément de type 3 (Morioka *et al.*, 1993 ; Rupalla *et al.*, 1998 ; Abraham & Lazar, 2000). Parmi les facteurs synthétisés par la microglie, IL-1 β et TNF- α sont les principales cytokines ayant pour effet d'aggraver les dommages post-ischémiques (Sairanen *et al.*, 1997 ; Botchkina *et al.*, 1997). Il a été montré que leur surexpression s'accompagne d'une aggravation de la lésion alors qu'à l'inverse, l'inhibition de leur expression entraîne une diminution du volume de lésion (Yamasaki *et al.*, 1995 ; Barone *et al.*, 1997). La microglie va aussi synthétiser des chémokines telles que MIP-1 α (CCL3) et -2 (CXCL2) ainsi que CCR5, un récepteur de MIP-1 α et CX3CR1, un récepteur à la fractalkine (Lai & Todd, 2006). Des études réalisées sur des souris déficientes pour la fractalkine ont permis de mettre en évidence le rôle délétère de cette dernière au cours de l'ischémie (Soriano *et al.*, 2002 ; Dénes *et al.*, 2008). La RI microgliale est associée à la production de RL qui participent à l'aggravation des dommages tissulaires et du déficit fonctionnel provoqués par une ischémie cérébrale (Amantea *et al.*, 2009). L'activation des cellules microgliales s'accompagne également d'une augmentation de l'activité de la iNOS, entraînant une production de NO (Nakashima *et al.*, 1995) dont l'impact semble plus nuancé que celui des autres molécules pro-inflammatoires. En effet, alors qu'il est admis que le NO augmente le volume de lésion (Iadecola *et al.*, 1997), il participerait également au déclenchement des mécanismes de plasticité neuronale post-ischémique (Estrada & Murillo-Carretero, 2005).

Ces dernières années, le rôle délétère des cellules microgliales a été remis en question par un nombre croissant d'études. En effet, l'activation des cellules microgliales s'accompagne aussi de la synthèse de facteurs cytoprotecteurs (Wood, 1995 ; Marchetti & Abbracchio, 2005). Ainsi, la microglie va abondamment synthétiser du TGF- β en réponse à

une ischémie (Wiessner *et al.*, 1993 ; Zhu *et al.*, 2000). Des études ont montré qu'une injection pré-ischémique de TGF- β permettait de réduire la mort neuronale (McNeill *et al.*, 1994). Les cellules microgliales sont aussi capables de synthétiser du BDNF et de l'IGF-1 (Lee *et al.*, 2002 ; Hwang *et al.*, 2004 ; Lalancette-Hébert *et al.*, 2007 ; Narantuya *et al.*, 2010) dont la production a pour effet de diminuer le volume de la lésion et déclencher la plasticité neuronale post-ischémique (Beck *et al.*, 1994 ; O'Donnell *et al.*, 2002). Les cellules microgliales synthétisent aussi du GDNF, de l'érythropoïétine (EPO) et des thrombospondines capables de promouvoir la neuroplasticité (Chamak *et al.*, 1994 ; Bernaudin *et al.*, 1999 ; Batchelor *et al.*, 2008). De même, l'activation microgliale pourrait participer à une augmentation de la neurogenèse en favorisant la prolifération et la différenciation des progéniteurs neuronaux en neurones (Ekdahl *et al.*, 2009). Finalement, la microglie constitue également une source de métalloprotéinases matricielles, en particulier MMP-2 et -9, qui ont à la fois un effet délétère en déstabilisant la BHE et en favorisant la mort cellulaire et un effet bénéfique en facilitant la mise en place des mécanismes de réparation par la réorganisation de la matrice cérébrale (Lai & Todd, 2006). Un autre rôle bénéfique des cellules microgliales au cours de l'ischémie est de capturer le glutamate relargé par les neurones dans le milieu extracellulaire (Nakajima *et al.*, 2001). Alors qu'il est connu depuis longtemps que les astrocytes sont capables de capturer le glutamate libéré par les neurones, cette fonction n'a été révélée que plus récemment chez la microglie. Cette capture passe, là encore, par des transporteurs spécifiques du glutamate, tels que GLT-1 ("glial high affinity glutamate transporter") dont l'expression est augmentée suite à une ischémie (Lai & Todd, 2006). Enfin, les cellules microgliales en phagocytant les neutrophiles joueraient un rôle bénéfique en diminuant l'activité délétère de ces derniers qui passe par le relargage de nombreux composés pro-inflammatoires (Denès *et al.*, 2007).

Il semblerait que les facteurs de croissance présents au niveau de la lésion participent également à l'orientation de l'activité microgliale vers un profil d'avantage neuroprotecteur. En effet, une étude de Jiang *et al.* (2011), a montré que l'administration intranasale de BDNF chez des rats ayant subi une ischémie globale transitoire était associée à une diminution de la mort neuronale. Cette neuroprotection s'accompagne d'un plus grand nombre de cellules microgliales activées qui expriment moins de TNF- α et plus d'IL-10 que chez les rats n'ayant pas reçu de traitement.



E Distinction entre microglie et macrophages

La microglie est fréquemment considérée comme étant les macrophages résidents du SNC. Cette affirmation est correcte dans le sens où les cellules microgliales sont capables de se transformer en phagocytes lorsque cela est nécessaire. Cependant, la microglie à l'état quiescent ne présente pas d'activité de phagocytose. De plus, elle ne doit pas être confondue avec les phagocytes mononucléés que l'on retrouve à la périphérie des vaisseaux, au niveau des méninges et des plexus choroïdes et qui possèdent une activité constitutive de phagocytose. En effet, les phagocytes mononucléés présentent une morphologie amiboïde et expriment à leur surface ED1 (ou CD-68 chez l'Homme, une protéine associée à la membrane des lysosomes et des endosomes) et ED2 ainsi que des molécules du CMH de classe II (Davoust *et al.*, 2008).

Au stade final de leur activation, les cellules microgliales acquièrent une morphologie amiboïde et expriment un certain nombre de molécules, ce qui ne permet pas de les distinguer des macrophages infiltrant le SNC lors d'une lésion cérébrale. Dans le but d'étudier les contributions respectives des cellules microgliales phagocytiques et des macrophages dans la pathologie ischémique, diverses stratégies expérimentales ont été développées. La première

est basée sur une destruction presque totale des monocytes présents dans le sang et les organes lymphoïdes par un traitement avec des liposomes contenant du dichloro-méthylène diphosphonate (Schroeter *et al.*, 1997). Cette technique a permis de montrer que les monocytes n'infiltraient la lésion qu'au bout de 6 j chez le rat soumis à une ischémie focale et que l'essentiel de l'activité phagocytaire était assurée aux temps courts par les cellules microgliales (Stoll *et al.*, 1998). Ces résultats ont été confortés par d'autres études utilisant comme stratégie la transplantation de moelle osseuse de souris exprimant constitutivement la GFP à des souris préalablement irradiées. Les macrophages de ces souris sont donc naturellement fluorescents contrairement aux cellules microgliales (Schilling *et al.*, 2003). L'utilisation de ce modèle a ainsi permis de confirmer le délai de plusieurs jours précédant l'infiltration des macrophages et le rôle prépondérant de la microglie dans la réponse précoce à l'ischémie cérébrale (Schilling *et al.*, 2003 ; Schilling *et al.*, 2005).

Aujourd'hui, bien qu'il existe de nombreux marqueurs des cellules microgliales chez différentes espèces, il n'existe pas encore de marqueur permettant de faire la discrimination entre la microglie activée phagocytaire et les macrophages. Ainsi, les marqueurs couramment utilisés (Iba1, Mac1, CD11b, ED1...) permettent une distinction entre la microglie et les autres cellules cérébrales (neurones et autres cellules non-neuronales) mais pas entre les cellules microgliales et les macrophages issus de l'infiltration de monocytes dans le SNC. Ainsi, des études d'expression de près de 19 000 gènes dans des cellules microgliales et des macrophages activés à l'aide de LPS et d'IFN- γ , n'ont pas permis de mettre en évidence la présence de marqueurs spécifiques permettant de distinguer ces deux populations (Schmid *et al.*, 2009).

IV La Neuroplasticité

A Historique

Le concept de plasticité en neurosciences a été introduit pour la première fois par Ernesto Lugaro en 1906. Cependant, les premières études d'importance sur la capacité d'adaptation du cerveau ont été initiées seulement à la fin des années 40 par Donald Hebb. Ce dernier a montré chez le Rat que les connections neuronales au sein du cortex étaient modelées et augmentées en fonction de l'environnement extérieur. Ainsi, il a observé une plus grande capacité d'apprentissage et de mémorisation chez des rats placés dans un milieu

enrichi que chez des rats hébergés dans de simples cages (Brown, 2006). De plus, des études ont montré que la neuroplasticité ne se limitait pas seulement à une augmentation du nombre de connections neuronales mais pouvait se traduire par des changements importants de l'organisation du réseau neuronal. En effet, les neurones seraient capables de s'adapter et de changer de fonction selon la nature de l'environnement et des stimulations qu'ils reçoivent. Ainsi, la stimulation tactile et répétée d'un seul doigt de la main chez le Singe conduit à un agrandissement de la zone d'activité neuronale du cortex somatosensible correspondante à ce doigt (Jenkins *et al.*, 1990). De même, des études ont révélé que le cortex visuel de personnes aveugles de naissance était utilisé pour la discussion et l'audition (Weeks *et al.*, 2000).

Néanmoins, au delà de son rôle d'adaptation au quotidien, la neuroplasticité est particulièrement forte au cours de certaines périodes de la vie. Tout d'abord, c'est lors de la formation du cerveau chez le fœtus mais également pendant les premières années de la vie que les mécanismes neuroplastiques sont le plus sollicités. Par la suite, une diminution de la plasticité neuronale est observée avec l'âge. Des études ont montré que la partie antérieure du corps calleux, cruciale pour la coordination des deux mains, était plus développée chez les musiciens ayant commencé la pratique de leur instrument avant 7 ans que chez ceux ayant commencé plus tardivement (Schlaug *et al.*, 1995). Une fois la phase d'apprentissage de l'individu passée, une augmentation de la neuroplasticité peut être observée ponctuellement en réponse à des lésions cérébrales dans le but de restaurer le réseau neuronal. Ainsi, des études menées chez le Singe ont montré que la lésion d'une partie du cortex moteur responsable du contrôle de la main s'accompagnait d'une respecialisation de la zone responsable du contrôle du coude et de l'épaule afin de prendre en charge le contrôle de la main (Frost *et al.*, 2003). De plus, il a été mis en évidence que des exercices de rééducation avaient pour effet de diminuer la taille de la zone lésée et d'augmenter la récupération fonctionnelle (Nudo, 2006).

Au cours de ces dernières années, les nombreuses études qui se sont intéressées à la neuroplasticité ont permis d'identifier les principales composantes neuroanatomiques participant à la réorganisation des réseaux neuronaux. Il s'agit de la croissance axonale, la synaptogenèse et la neurogenèse.

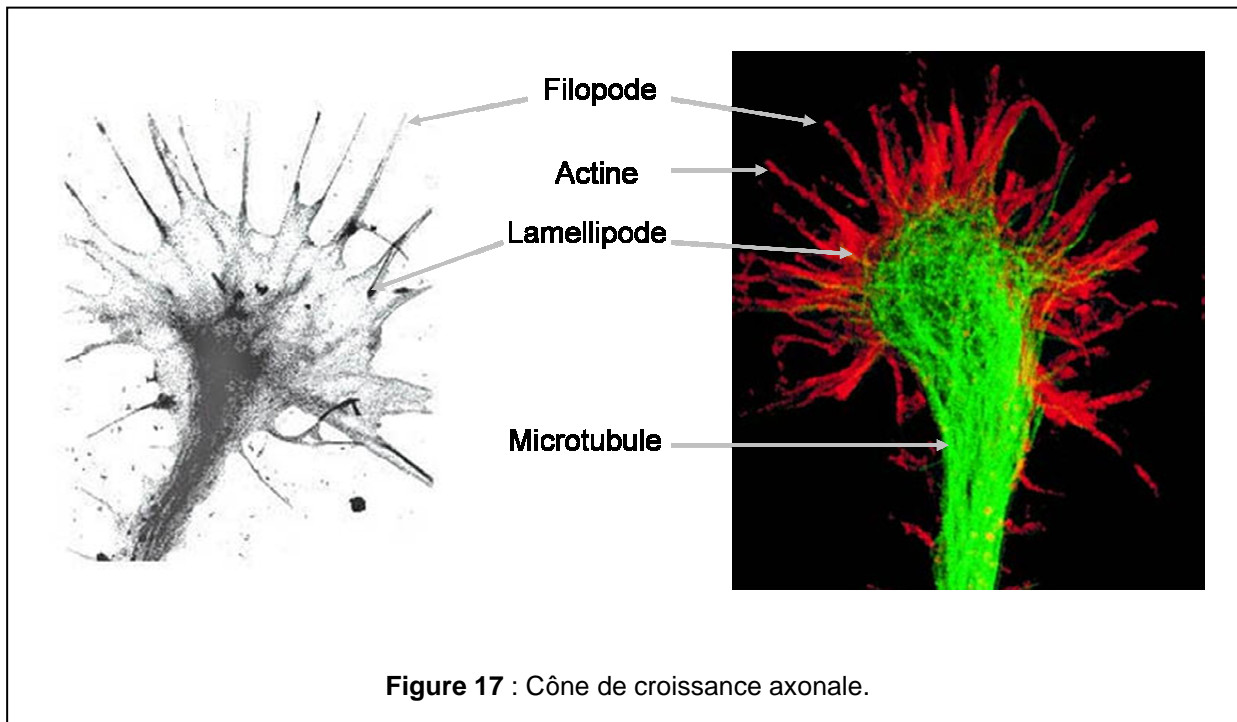
B La croissance axonale

Les principaux mécanismes mis en jeu au cours de la croissance axonale encore appelée extension des neurites passent par la réorganisation d'éléments du cytosquelette.

Cette réorganisation est induite par des protéines associées aux microtubules et par les Rho-GTPases (guanine triphosphate) (Bouquet *et al.*, 2004 ; Riederer, 2007). Elle est contrôlée par un large panel de récepteurs membranaires qui fixent de nombreux ligands agissant sur la croissance des axones (Gaillard *et al.*, 2005).

1) Cônes de croissance axonale

Les cônes de croissance sont des structures situées à l'extrémité des axones en développement qui ont été décrits pour la première fois par Ramon y Cajal en 1890. Ils sont formés d'un domaine cytoplasmique central riche en microtubules et en organelles. Ce domaine central est surmonté par un domaine cortical périphérique qui émet de multiples projections de filaments d'actine nommées filopodes, soutenus par des lamellipodes qui sont des structures d'actine disposées en feuillet (figure 17).



Les microtubules sont des filaments composés d'hétérodimères d' α - et de β -tubuline qui présentent une polarité avec une extrémité se polymérisant rapidement et une autre se dépolymérisant lentement (Heidemann *et al.*, 1981). La polymérisation des microtubules permet un allongement progressif de l'axone. Les filopodes sont donc des structures présentant des cycles réguliers de formation et d'extension suivis d'une rétractation. Ils servent ainsi de senseurs explorant l'environnement autour du cône de croissance (Davenport *et al.*, 1993). En effet, la croissance axonale est contrôlée par de nombreux messagers qui

vont favoriser ou inhiber l'élongation, et c'est la balance entre les différents messagers présents dans l'environnement qui va déterminer la direction et l'importance de l'allongement de l'axone. Des études récentes ont pu mettre en évidence que la balance entre les forces antagonistes de la dynéine, un transporteur des microtubules et de la myosine II, un transporteur rétrograde de l'actine, était fondamentale dans le contrôle de l'interaction entre les microtubules et l'actine et jouait un rôle dans la direction et l'intensité de l'élongation de l'axone (Myers *et al.*, 2006).

2) Facteurs contrôlant la croissance axonale

De très nombreux facteurs sont capables d'influencer la croissance axonale. Il a ainsi été mis en évidence une action des molécules suivantes : éphrines, nétrines, sémaphorines, facteurs de croissance, composés de la MEC, CAM et neurotransmetteurs (pour revue voir Hou *et al.*, 2008).

Les neurotrophines sont les facteurs de croissance ayant le plus d'impact sur la croissance axonale, en agissant via l'activation des récepteurs à tyrosine kinase (TrkA, TrkB et TrkC) et du récepteur au neurotrophine p75 (p75NTR) (Barbacid, 1995). Ainsi, le NGF, le BDNF et NT-3 sont à l'origine d'une modification de la réponse du cône de croissance aux différentes molécules guidant la croissance axonale (Tuttle & O'Leary, 1998). En présence de ces neurotrophines, les axones seraient plus sensibles aux activateurs de croissance et moins sensibles aux inhibiteurs (Tuttle & O'Leary, 1998). D'autres facteurs de croissance ont également un effet sur l'élongation de l'axone : IGF-1, GDNF, TGF- β , EGF ("epidermal growth factor") et FGF ("fibroblast growth factor") induisent une augmentation de la croissance axonale (Hou *et al.*, 2008).

La composition de la MEC, qui constitue l'environnement immédiat du cône de croissance axonale, joue également un rôle essentiel sur son fonctionnement et par voie de conséquence sur la croissance axonale. En effet, il a été montré que les glycoprotéines de la MEC (laminine et fibronectine) en se fixant sur les récepteurs aux intégrines sont des molécules clés du développement neuronal (Baron Van Evercooren, 1996). Ainsi, un changement de direction du cône de croissance et une augmentation de la vitesse d'élongation de l'axone en direction de la source de laminine ont été rapportés et ce, grâce à la capacité de la laminine à moduler les processus dynamiques de polymérisation/dépolymérisation de l'actine des filopodes (Kuhn *et al.*, 1995). L'implication des récepteurs des intégrines β 1 et de la PKC a également été mise en évidence dans ces processus en utilisant divers inhibiteurs spécifiques (Kuhn *et al.*, 1995). A l'opposé, les protéoglycanes, en particulier le sulfate de

chondroïtine, inhibent la croissance axonale en perturbant l'action de la laminine (Wilson & Snow, 2000). En conséquence, la balance entre protéoglycanes et les autres glycoprotéines au sein de la MEC constitue donc un élément important du contrôle de la croissance axonale nécessaire à l'établissement des réseaux neuronaux.

Il existe de nombreux autres facteurs régulant la croissance axonale qui sont sécrétés au sein du milieu extracellulaire :

- les sémaphorines sont une famille de protéines possédant des domaines caractéristiques riches en cystéine. Elles jouent un rôle dans la formation des systèmes cardiovasculaire, endocrinien, immunitaire, reproducteur et respiratoire, ainsi que dans le développement du cerveau (Yazdani & Terman, 2006). Elles ont un effet repoussant pour les cônes de croissance. En effet, lorsqu'elles se fixent sur leurs récepteurs, qui sont de la famille des neuropilines ou des plexines, elles entraînent une dépolymérisation des filaments d'actine (Morita *et al.*, 2006),
- les nétrines sont des protéines présentant un domaine riche en acides aminés basiques, ce qui leur permet d'interagir avec de nombreux composés de la MEC et de la membrane des cellules. Elles exercent un effet variable en fonction des neurones concernés, chemoattractant pour certains comme les neurones de la rétine et chemorepoussant pour d'autres comme les neurones du ganglion spinal (Dickson, 2002 ; Masuda *et al.*, 2009),
- les éphrines sont une famille de protéines regroupées en deux catégories : A et B. Elles induisent chacune un effet opposé sur le cône de croissance axonale : stimulant pour les éphrines B et inhibant pour les éphrines A (Davy & Soriano, 2005). Au-delà de leur rôle dans la croissance axonale, les éphrines interviennent aussi dans l'angiogenèse (Zhang & Hughes, 2006),
- les protéines Slit qui sont au nombre de trois et sont reconnues par les récepteurs Robo ("roundabout"). Elles présentent un rôle stimulant ou inhibant pour l'élongation de l'axone (Brose & Tessier-Lavigne, 2000),
- les RGM ("repulsive guidance molecule") récemment identifiées, qui sont capables de repousser les axones (Matsunaga *et al.*, 2004),
- finalement, il existe tout un ensemble de composés issus de la myéline qui sont relargués en réponse à une lésion cérébrale ayant un effet inhibiteur sur la croissance axonale. Ainsi, des facteurs tels que Nogo, les MAG ("myeline associated glycoprotein"), les OMag ("oligodendrocyte MAG") et les CSPG ("myeline-associated chondroitin sulfate proteoglycan") relargués par les oligodendrocytes et les cellules de

Schwann repoussent les cônes axonaux (Sandvig *et al.*, 2004). Ainsi, l'utilisation d'anticorps dirigés contre Nogo-A permet de favoriser la récupération fonctionnelle chez des rats ayant subi une lésion corticale (Brenneman *et al.*, 2008).

3) Mécanismes de régulation de la croissance axonale

La fixation de ces différents ligands sur leurs récepteurs peut conduire à une déstabilisation du cytosquelette selon trois voies de signalisation :

- la voie des Rho-GTPases est la voie majeure de régulation de la croissance axonale mais également des autres mécanismes de plasticité neuronale (Govek *et al.*, 2005). Elle passe par le déclenchement d'une cascade de phosphorylation dont l'une des cibles terminales sont les CRMP ("collapsin response mediator protein"), qui sont capables d'altérer la structure des microtubules et des filaments d'actine (Franken *et al.*, 2003),
- la voie PI₃K ("phosphoinositide 3-kinase")/Akt est connue pour son rôle dans la survie cellulaire. Cependant, elle a récemment été mise en avant pour son rôle dans de nombreux aspects de la mobilité et de l'adhésion cellulaire. Son activation conduit au recrutement de la GSK-3 β ("glycogen synthase kinase") qui va à son tour phosphoryler et moduler l'activité des CRMP (Yoshimura *et al.*, 2005).
- la voie Fyn-Cdk5 ("cyclin-dependent kinase 5") passerait par l'activation de Fyn, une tyrosine kinase et de Cdk5, une sérine/thréonine kinase (Morfini *et al.*, 2004).

C Synaptogenèse

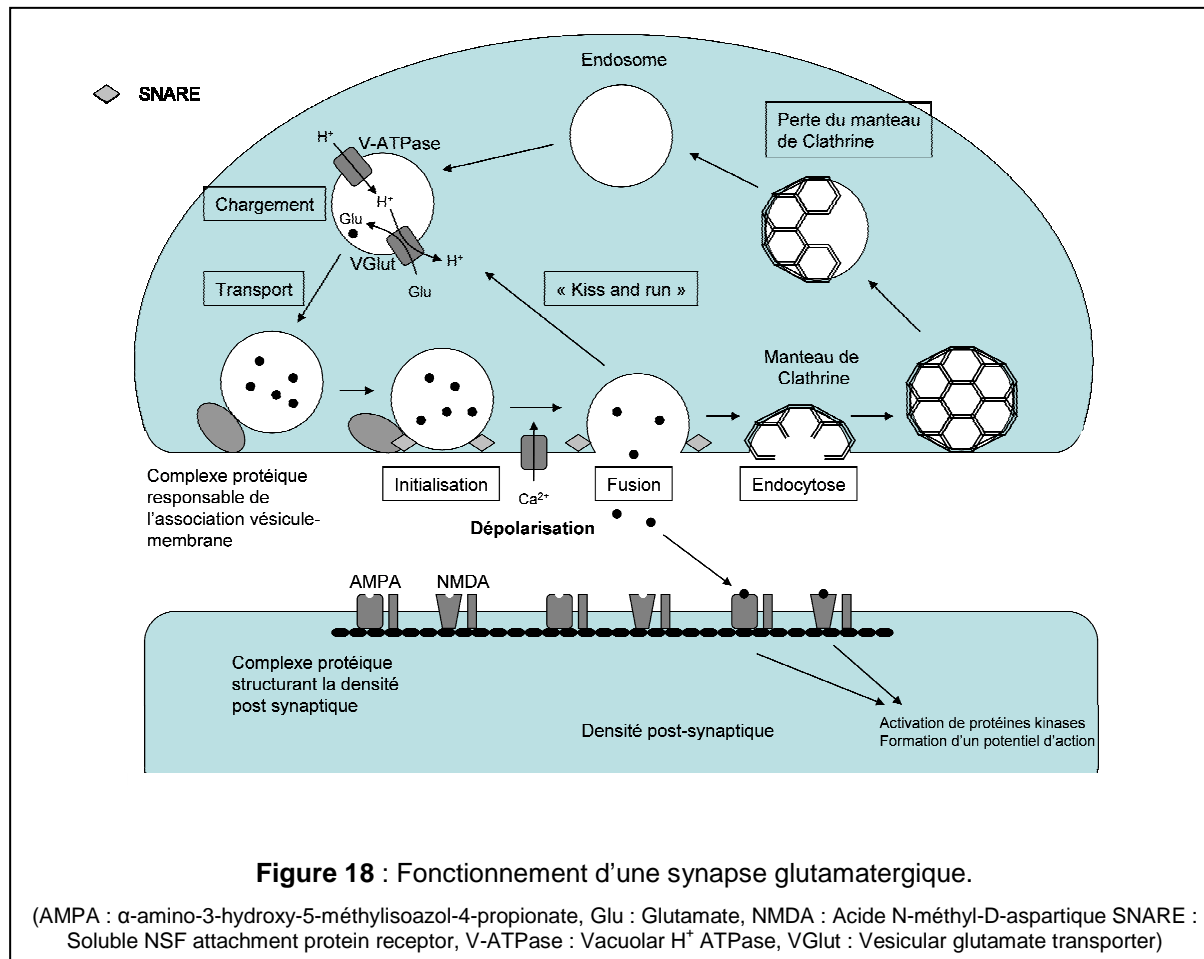
Les synapses sont formées de trois éléments : l'élément pré-synaptique, la fente synaptique et l'élément post-synaptique (figure 18). La structure et l'activité de la synapse sont là encore contrôlées par de nombreuses protéines. Du côté pré-synaptique se trouvent les vésicules synaptiques qui contiennent les neurotransmetteurs et du côté post-synaptique se trouve une région appelée densité post-synaptique. Cette région est un complexe multi-protéique regroupant les récepteurs aux neurotransmetteurs ainsi que des molécules d'adhésion et de nombreuses autres protéines nécessaires au fonctionnement post-synaptique (Kim & Sheng, 2004). Les membranes pré- et post-synaptiques sont maintenues en contact grâce à l'interaction de CAM. Parmi les immunoglobulines impliquées dans le maintien de la synapse, on peut citer entre autres : les neurexines et les neuroligines, les éphrines et leurs

récepteurs, les cadhérines et les SynCAMs ("synaptic cell adhesion molecules") (Biederer *et al.*, 2002 ; Shapiro *et al.*, 2007).

Le fonctionnement de la synapse comporte plusieurs étapes. Tout d'abord, il y a formation des vésicules synaptiques du côté pré-synaptique. Le stockage vésiculaire des neurotransmetteurs nécessite l'activité de protéines transmembranaires dont le rôle est de transporter les neurotransmetteurs à l'intérieur des vésicules. Par exemple, la protéine VGlut ("vesicular glutamate transporter") responsable de l'accumulation de glutamate dans les vésicules et la protéine V-ATPase ("vacuolar H⁺ ATPase") sont à l'origine d'un gradient de protons pouvant être utilisés pour faire entrer des neurotransmetteurs. La membrane des vésicules contient également des protéines permettant leur migration. On peut notamment citer la synaptophysine, la synaptogyrine, la synaptogamine, la synaptobrevine ainsi que SV2 ("synaptic vesicle glycoprotein 2") (Abraham *et al.*, 2006). Une fois formées, les vésicules matures vont stationner à proximité de la membrane pré-synaptique. Elles sont prises en charge par un complexe incluant de nombreuses protéines telles que Munc13 ("Unc-13 homolog"), Rab3, Bassoon, Piccolo, les protéines de la famille ERC ("ELKS/Rab6-interacting/CAST"), liprine- α , MINT1 ("munc-18 interacting protein 1"), MALS ("mammalian abnormal cell lineage 7") et CASK ("calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase") (Chua *et al.*, 2010). L'influx de calcium provoqué par le potentiel d'action arrivant au niveau de la synapse, s'accompagne de réactions ATP-dépendantes, conduisant à la fusion de la membrane de la vésicule synaptique avec la membrane pré-synaptique. C'est la synaptogamine servant de senseur au calcium qui déclenche la fusion membranaire et l'exocytose. Les SNAREs ("soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor") sont au centre de la machinerie cellulaire en permettant la fusion des membranes (Jahn & Scheller, 2006). Par la suite, selon leur nature, les neurotransmetteurs sont soit dégradés dans la fente synaptique, soit feront l'objet d'une recapture par la terminaison pré-synaptique avec formation d'une nouvelle vésicule par endocytose. Cette endocytose peut suivre deux voies, une endocytose médiée par la clathrine qui forme une enveloppe au niveau de la membrane plasmique et la contraint à former une vésicule, ou une endocytose du type "kiss and run" qui implique une reformation de la vésicule synaptique juste après sa fusion avec la membrane pré-synaptique.

Du côté post-synaptique, la densité post-synaptique a pour fonction de regrouper les récepteurs et de servir d'interface entre le cytosquelette et les CAM, ce qui permet de maintenir la structure de la synapse. Les protéines permettant la formation de cette région sont les SAP-90 ("synapse-associated protein"), les SAPAP ("SAP-90-associated protein") et les

Shank ("SH3 domain and ankiryn repeat protein") qui interagissent avec les récepteurs aux neurotransmetteurs, les molécules d'adhésion et les filaments d'actine (Chua *et al.*, 2010). La fixation du neuromédiateur entraîne l'ouverture du canal ionique associé au récepteur et est à l'origine d'un influx d'ions à l'intérieur de la cellule.



Au sein du cerveau, il existe en continu un processus dynamique de formation et de disparition de synapses. En effet, il a été rapporté qu'environ 20 % des synapses du cortex de la souris disparaissent chaque jour, mais que la formation de nouvelles synapses compensait cette perte. De plus, environ 40 % des synapses persisteraient moins de 8 j et environ 50 % moins d'un mois (Trachtenberg *et al.*, 2002). La formation et le maintien ou la disparition des synapses sont liés à l'activité des différents réseaux neuronaux (Jenkins *et al.*, 1990). Cependant, les mécanismes moléculaires exacts intervenant dans ce phénomène restent à déterminer précisément. La formation de nouvelles synapses, comme la croissance axonale, passent par la formation de protrusions dendritiques du genre filopodes (Petruk *et al.*, 2005). Il a ainsi été montré que l'extrémité de ces filopodes s'associait préférentiellement avec des terminaisons axonales présentant déjà des synapses (Toni *et al.*, 2007). La spécificité de

l'association entre les neurones est déterminée par de nombreux facteurs tels que les molécules d'adhésion et certains facteurs extracellulaires. Ainsi, l'interaction entre les intégrines Sidekick-1 et -2 ou DSCAM/DSCAML ("Down syndrome CAM") joue un rôle essentiel dans l'organisation correcte des différentes couches de neurones de la rétine (Yamataga & Sanes, 2008). D'autres études ont également montré qu'une autre intégrine, la neurofascine était nécessaire à la formation de synapses au niveau du segment initial de l'axone des cellules de Purkinje (Ango *et al.*, 2004). De même, les neurexines et les neuroligines sont suffisantes pour induire la formation de synapses *in vitro*, les neurexines étant du côté pré-synaptique et les neuriligines, leurs récepteurs étant du côté post-synaptique (Ushkaryov *et al.*, 1992 ; Ichtchenko *et al.*, 1995). Elles semblent entre autre jouer un rôle important dans la stabilisation des synapses *in vivo* (Sudhof, 2008). Des études sur des cocultures de neurones et de fibroblastes ont montré que les CAM exprimées à la surface des cellules voisines des neurones pouvaient intervenir dans la formation des synapses. La SynCAM et le NGL ("neutrin G ligand") induisent la formation d'extrémités pré-synaptiques lorsqu'elles sont exprimées par les cellules non-neurales (Biederer *et al.*, 2002 ; Kim *et al.*, 2006). Les facteurs sécrétés dans le milieu extracellulaire influencent également la synaptogenèse. Par exemple, les protéines Wnt ("wingless-related mouse mammary tumor virus integration site") ont été identifiées comme jouant un rôle dans la formation de synapses au niveau du cervelet de souris. Ainsi, des antagonistes de Wnt bloquent la formation de synapses alors que le Wnt-7a, molécule normalement sécrétée par les granulocytes, stimule leur formation (Hall *et al.*, 2000). L'activité des protéines Wnt passe par leur fixation aux récepteurs de la famille Fzs ("frizzleds") à l'origine du recrutement de Dvl ("dishevelled") et de la GSK-3 β qui va phosphoryler la β -caténine. Cette dernière est alors transloquée dans le noyau et active différents facteurs de transcription (Salinas & Zou, 2008). De manière intéressante, les Wnt en favorisant ou inhibant la synaptogenèse en fonction de la nature du neurone étudié, participeraient au contrôle de l'organisation des réseaux neuronaux (Margeta & Shen, 2010). Une autre molécule synthétisée par les granulocytes est impliquée dans la synaptogenèse : le FGF (Umemori *et al.*, 2004). D'autres facteurs modulant la synaptogenèse sont également produits par d'autres types cellulaires. Ainsi, un certain nombre de facteurs produits par les cellules gliales (microglie et astrocytes) jouent un rôle dans la formation de nouvelles synapses. Par exemple, le BDNF et IGF-1 jouent un rôle important dans la synaptogenèse au cours du développement et chez l'adulte (Joseph d'Ercole & Ye, 2008 ; Waterhouse & Xu, 2009). De plus, il a été montré que les thrombospondine-1 et -2 favorisaient la formation de nouvelles synapses *in vitro* (Christopherson *et al.*, 2005). A

l'inverse, les cellules gliales ont également été impliquées dans l'élimination des synapses, via le système du complément ou via la semaphorine Sema3E qui ont un effet répulsif sur les synapses (Stevens *et al.*, 2007 ; Pecho-Vrieseling *et al.*, 2009). Les cellules microgliales influenceraient aussi la formation des synapses via la protéine KARAP/DAP12 qui contrôlerait la synthèse du récepteur au BDNF (Roumier *et al.*, 2004).

D Neurogenèse

La neurogenèse consiste en la génération, la maturation et la migration de neurones au sein du cerveau. Si cette fonction est très présente chez l'embryon et au stade périnatal, elle est beaucoup plus limitée chez l'adulte. La neurogenèse est maintenant bien établie dans deux régions cérébrales distinctes : la zone sous-granulaire (SGZ) du dentate gyrus de l'hippocampe ainsi que dans la zone sous-ventriculaire (SVZ) du proencéphale. Dans ces régions germinatives, des cellules souches neurales sont capables de donner naissance à des neurones fonctionnels qui vont pouvoir intégrer les réseaux neuronaux (Lie *et al.*, 2004). Ces cellules, qui présentent une morphologie étoilée semblable à la glie, sont capables de proliférer et de donner naissance à des cellules neuronales immatures appelées les neuroblastes (Kempermann *et al.*, 2004). Elles expriment la protéine GFAP, le principal composant des filaments intermédiaires des astrocytes. En effet, Garcia *et al.* (2004) ont mis en évidence l'expression de GFAP au cours de la neurogenèse en utilisant des souris transgéniques exprimant le gène HSV-TK ("herpes simplex virus thymidine kinase"), sensibilisant les cellules au ganciclovir, sous le contrôle du promoteur de GFAP. Les souris ainsi transformées présentent une ablation des cellules souches neuronales lorsqu'elles sont traitées au ganciclovir.

Les cellules souches neurales sont confinées au sein de niches neurogéniques qui fournissent un environnement propice à leur prolifération et à leur différenciation (Lledo *et al.*, 2006). Ces niches contiennent également des astrocytes et des cellules endothéliales qui entourent les cellules souches. D'une manière générale, les cellules endothéliales induisent la multiplication des cellules souches neurales (Shen *et al.*, 2004) tandis que les astrocytes participent à leur maturation en neurones (Song *et al.*, 2002). Les cellules microgliales semblent également jouer un rôle dans la niche neurogénique, via le relargage de composés influençant la neurogenèse ou la phagocytose des cellules nouvellement formées ayant subi une apoptose (Sierra *et al.*, 2010). Cependant, comme nous l'avons vu dans la partie III, il faut bien garder à l'esprit que la nature des composés relargués par la microglie varie en

fonction du type de stimulus à l'origine de son activation. Ainsi, l'impact de la microglie sur la neurogenèse peut être variable. Par exemple, l'activation de la microglie par le LPS entraîne une diminution de 85 % du nombre de neurones néoformés (Ekdahl *et al.*, 2003). Il a été montré à l'inverse que la microglie pouvait également favoriser la neurogenèse en synthétisant un certain nombre de facteurs neurotrophiques en réponse à une ischémie (Lee *et al.*, 2002 ; Hwang *et al.*, 2004). De même, l'injection de cellules microgliales a été associée à une augmentation de l'expression de facteurs trophiques et à une meilleure récupération fonctionnelle lors d'une ischémie cérébrale (Narantuya *et al.*, 2010).

De nombreuses molécules interviennent dans la régulation des mécanismes de la neurogenèse. Elles peuvent provenir soit des cellules de la niche neurogénique soit d'autres régions du cerveau. Parmi les facteurs synthétisés localement, on peut citer la molécule d'adhésion cellulaire neurale (NCAM) qui favorise la prolifération et la différenciation neuronale (Amoureux *et al.*, 2000). A l'opposé, l'expression de CD24, une molécule d'adhésion exprimée par la plupart des lymphocytes B, conduit à une diminution de la prolifération cellulaire (Belvindrah *et al.*, 2002). La voie des Notch a pour rôle de maintenir le stock de progéniteurs. Elle favorise donc la prolifération des cellules souches mais inhibe leur différenciation en neurones (Hitoshi *et al.*, 2002). Les cellules souches neurales expriment des protéines de la famille des BMP ("bone morphogenetic protein") ainsi que leurs récepteurs, ces protéines permettent de contrôler la différenciation des cellules neurales. En effet, en l'absence de ces protéines, les cellules tendent à se différencier en cellules gliales alors qu'elles forment des neurones lorsque cette voie est activée (Ueki *et al.*, 2003). La neurogenèse met en jeu l'activation de certains facteurs de transcription. Ainsi, il a été montré que les facteurs de transcription EF2 intervenaient au cours de ce processus (Cooper-Kuhn *et al.*, 2002). De même, les facteurs de transcription PAX6 ("paired box 6") et OLIG2 ("oligodendrocyte transcription factor") ont pour effet respectif d'augmenter et de réduire la neurogenèse lorsqu'ils sont surexprimés (Lledo *et al.*, 2006). Le calcium ainsi que le principal neurotransmetteur inhibiteur, le GABA, ont également un impact sur la neurogenèse. La signalisation par le GABA entre les astrocytes et les neuroblastes a pour effet de limiter leur prolifération alors que le calcium augmente leur différenciation en neurones (Deisseroth *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2005). En ce qui concerne les facteurs extrinsèques à la niche influençant la neurogenèse, il convient tout d'abord de s'intéresser aux neuromédiateurs. Le glutamate exerce un effet paradoxal sur la neurogenèse. En effet, il inhiberait la division cellulaire en se fixant sur les récepteurs NMDA ou sur les récepteurs métabotropiques mais il augmenterait la prolifération en se fixant sur les récepteurs AMPA (Bernabeu *et al.*, 2000 ; Bai *et al.*, 2003 ;

Yoshimizu *et al.*, 2004). L'acétylcholine, la noradrénaline ainsi que la sérotonine stimulent la neurogenèse alors qu'à l'inverse, la dopamine et le NO semblent la diminuer (Lledo *et al.*, 2006). Cependant, l'impact du NO reste controversé, puisque des études ont montré qu'il était également capable de stimuler la neurogenèse (Sulz & Bacigalupo, 2006). De très nombreux facteurs de croissance interviennent dans la prolifération neuronale. Par exemple, une augmentation du taux de BDNF s'accompagne d'une augmentation de la prolifération qui peut être bloquée en utilisant des anticorps dirigés contre ce dernier (Katoh-Semba *et al.*, 2002). Diverses études ont pu également mettre en évidence une augmentation de la neurogenèse en présence des facteurs suivants : VEGF ("vascular endothelial growth factor"), IGF-1, FGF2, CNTF ("ciliary neurotrophic factor"), HB-EGF ("heparin binding epidermal growth factor"), EGF, TGF- β (Lledo *et al.*, 2006). De plus, il a été rapporté que des hormones telles que les corticostéroïdes mais également les hormones ovariennes étaient susceptibles de diminuer la neurogenèse (McEwen, 1996 ; Gould *et al.*, 1997). Finalement, il est important de souligner que 50 % des neurones néoformés, qui parviennent à migrer, puis à se différencier avec succès, ne survivent pas plus d'un mois après leur formation (Petreanu & Alvarez-Buylla, 2002).

E Neuroplasticité en réponse à un AVC ischémique

Comme nous l'avons décrit précédemment, l'AVC s'accompagne de la mort de nombreux neurones. Cette mort neuronale est à l'origine d'un déficit fonctionnel chez le patient. En réaction, le cerveau va mettre en place des mécanismes lui permettant de compenser au maximum la perte fonctionnelle induite par la lésion.

1) Récupération fonctionnelle

Malgré la perte définitive du tissu lésé, la plupart des patients survivants à un AVC présentent une récupération fonctionnelle spontanée. Cependant, cette récupération varie fortement d'un patient à l'autre mais aussi en fonction de la localisation et de la taille de la lésion. Néanmoins, il a été montré que la rééducation par la stimulation des réseaux endommagés permettait d'amplifier ce phénomène. Ainsi, obliger les patients à utiliser leur main affaiblie, dans le cas de lésions au niveau des faisceaux pyramidaux, permettrait d'augmenter la récupération (Wittenber *et al.*, 2003). Chez l'animal, il a également été montré que l'utilisation d'environnements enrichis était associée à une plus grande plasticité cérébrale et à une meilleure récupération fonctionnelle (Knieling *et al.*, 2009 ; Saucier *et al.*, 2010).

Même si elle se prolonge pendant au moins 6 mois chez l'homme, la récupération fonctionnelle a lieu majoritairement dans le mois suivant la survenue de l'AVC (Duncan *et al.*, 2000). Différentes études ont montré que le maximum de la récupération était atteint pour 95 % des patients au bout de 9 semaines pour la motricité du bras (Nakayama *et al.*, 1994) et au bout de 6 semaines pour le langage (Pedersen *et al.*, 1995). Plusieurs mécanismes sont à l'origine de cette récupération fonctionnelle :

- la diminution de l'œdème vasogénique qui diminue la pression intracrânienne,
- la réactivation potentielle de neurones de la pénombre qui étaient dysfonctionnels et qui retrouvent leur activité,
- l'activation de circuits neuronaux alternatifs qui étaient silencieux avant la survenue de l'AVC. Ces circuits parallèles passent principalement par l'hémisphère contralatéral à la lésion (Pascual-Leone *et al.*, 2005). En effet, la lésion induit un arrêt de l'inhibition transcallosale et permet une plus grande activation de l'hémisphère intact (Liepert *et al.*, 2000),
- la mise en place de mécanismes d'apprentissage des synapses : la plasticité homéostatique et la plasticité d'Hebbian (Murphy & Corbett, 2009). La plasticité homéostatique consiste en une diminution du seuil d'activation des synapses qui permet d'augmenter leur excitabilité (Turrigiano & Nelson, 2004). La plasticité d'Hebbian correspond à une augmentation de la sensibilité des synapses à des stimuli successifs rapprochés dans le temps, ce qui permet d'accroître leur excitabilité (Song *et al.*, 2000). Bien que ces mécanismes soient classiquement mis en œuvre lors de l'amélioration des réseaux neuronaux, leurs rôles dans la réponse à l'ischémie restent à démontrer clairement (Murphy & Corbett, 2009),
- la mise en place des mécanismes de neuroplasticité : croissance axonale, synaptogenèse et neurogenèse.

2) Croissance axonale

L'ischémie cérébrale s'accompagne d'une augmentation de la croissance axonale au niveau de la lésion (Dancause *et al.*, 2005). L'expression de GAP-43 ("growth associated protein 43"), fréquemment utilisée comme marqueur de la croissance axonale car il s'agit d'une protéine associée aux cônes de croissances capable d'interagir avec la membrane plasmique et les filaments d'actine, est notamment accrue entre le troisième et le quatorzième jour après une ischémie permanente chez le rat (Stroemer *et al.*, 1995). Aussi, sa

phosphorylation par la PKC s'accompagne d'une augmentation de la polymérisation des filaments d'actine et à l'inverse, son clivage par la calpaïne entraîne une dépolymérisation de ces derniers (Mosevitsky, 2005). Par ailleurs, il a été rapporté grâce à l'utilisation de souris KO pour GAP-43 que cette dernière était essentielle à l'effet neurotrophique du BDNF (Gupta *et al.*, 2009). En effet, la présence de BDNF est à l'origine d'une phosphorylation de GAP-43, qui s'accompagne d'un effet neuroprotecteur absent chez les souris invalidées. A la suite d'un AVC, la croissance axonale permet une réorganisation de la carte sensorielle et est à l'origine de nouvelles connexions à l'intérieur du cortex (Carmichael, 2006).

3) Synaptogenèse

Immédiatement après la survenue de l'ischémie, une rétractation des synapses et des dendrites, avec formation d'agrégats d'actine est observée au niveau des neurones (Zangh *et al.*, 2005). Le nombre de vésicules synaptiques présentes au niveau des synapses est également diminué (Kovalenko *et al.*, 2006). Ce n'est donc que plus tardivement que la synaptogenèse post ischémique, caractérisée par la croissance de filopodes, l'agrandissement de synapses existantes et la formation de nouvelles synapses, est observée dans la lésion. En effet, une augmentation de l'expression de la synaptophysine, marqueur de synaptogenèse, a été rapportée entre le 14^{ème} et 60^{ème} j en réponse à une ischémie permanente chez le Rat (Stroemer *et al.*, 1995). De même, lors d'une ischémie transitoire de 90 min, son expression est augmentée dans le cervelet entre le 7^{ème} et 14^{ème} j (Jung *et al.*, 2009). Enfin, il semble que la mise en place de ces mécanismes soit dépendante du Ca²⁺ et de l'activation des récepteurs NMDA (Jourdain *et al.*, 2002).

4) Neurogenèse

De nombreuses études ont montré que l'ischémie cérébrale induit une prolifération cellulaire dans les niches neurogéniques qui s'accompagne d'une augmentation de la neurogenèse dans la SGZ (x10) et la SVZ (x1,5-3) (Komitova *et al.*, 2006 ; Lichtenwalner & Parent, 2006). De plus, il est bien établi que chez le rongeur, la neurogenèse post-ischémique connaît un pic 7 à 10 j après l'induction de la lésion et se prolonge pendant plusieurs semaines. Cependant, il convient de garder à l'esprit que les études ont montré qu'on ne retrouve pas de neurones néoformés au niveau du cortex et que parmi ceux observés au niveau du striatum, peu deviennent des neurones matures (Collin *et al.*, 2005). Ainsi, une étude réalisée par Arvidsson *et al.* (2002) a estimé que le nombre de neurones néoformés survivants ne représente que 0,2 % du nombre de neurones morts suite à l'ischémie. Ce phénomène

pourrait s'expliquer par un déficit en facteurs neurotrophiques associé à l'absence de différenciation des neuroblastes au niveau des structures cérébrales lésées. Ces données peuvent expliquer les limites de l'impact de la neurogenèse dans la récupération fonctionnelle post-ischémique (Wieloch & Nikolic, 2006).

5) Facteurs synthétisés

L'ischémie cérébrale s'accompagne de la synthèse de nombreux facteurs susceptibles d'induire ou de supprimer les processus neuroplastiques. Des études ont en effet suggéré la participation du système glutamatergique, de facteurs de croissance, de médiateurs de l'inflammation ainsi que du NO dans le déclenchement de la neuroplasticité (Komitova *et al.*, 2006). Ainsi, les cytokines et certains médiateurs de l'inflammation pourraient jouer un rôle dans le déclenchement de la neuroplasticité à condition d'être présents à des taux relativement faibles (Vilcek & Feldmann, 2004 ; Di Filippo *et al.*, 2008), car il a été montré que des taux trop importants, par exemple d'IL-1 β ou d'IL-6, exerçaient à l'inverse un effet inhibiteur (Bellinger *et al.*, 1993 ; Bellinger *et al.*, 1995). Sachant qu'en réponse à l'ischémie un « pic » de cytokines est observé entre 12 et 24 h post-ictus, elles pourraient intervenir dans la mise en place des changements neuroplastiques à des temps plus longs une fois leurs taux retournés à des niveaux suffisamment bas (Kriz & Lalancette-Hébert, 2009). De même, la synthèse de nombreux facteurs trophiques tels que le VEGF, IGF-1, FGF, BDNF, G-CSF ("granulocyte colony-stimulating factor"), NGF, M-CSF, GM-CSF et CNTF par la microglie et les macrophages sont susceptibles de favoriser la formation de nouveaux neurones (Komitova *et al.*, 2006) ainsi que la croissance axonale (Wieloch & Nikolic, 2006). Dans des conditions normales, le glutamate diminue la neurogenèse au niveau du dentate gyrus en activant les récepteurs NMDA (Cameron *et al.*, 1995). Cependant, le blocage des récepteurs NMDA ou AMPA à l'aide d'antagonistes, comme MK-801 ((+)-5-méthyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine maléate) ou NBQX (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione), ne promeut pas pour autant la neurogenèse post-ischémique (Bernabeu & Sharp, 2000). Par conséquent, même si le glutamate semble nécessaire à la neurogenèse, les mécanismes exacts de son implication dans la formation de nouveaux neurones restent à élucider. En ce qui concerne le NO, ces effets sur la neurogenèse dépendent de son origine cellulaire. Ainsi, le NO issu de l'activation de la nNOS inhiberait la neurogenèse tandis que le NO produit lors de l'activation de la eNOS et de la iNOS augmenterait la neurogenèse en réponse à l'ischémie (Zhu *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2005 ; Sun *et al.*, 2005). Cependant, les raisons expliquant les différences constatées sur l'impact du

NO synthétisé par la iNOS ou la nNOS sur la neurogenèse ne sont pas connues. Finalement, la synthèse d'autres facteurs tels que l'EPO et l'acide rétinolique semble avoir un effet bénéfique sur la formation de nouveaux neurones (Wang *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2005).

Il faut également noter que les astrocytes, constituant la cicatrice gliale, synthétisent des facteurs inhibiteurs de la plasticité tels que la vimentine ou la nestine (Pekny & Pekna, 2004) alors qu'à l'inverse la région entourant la cicatrice gliale présente un taux réduit de molécules inhibant la croissance axonale (Carmichael *et al.*, 2005). Les oligodendrocytes relarguent également dans la lésion de nombreux composés inhibant la croissance des axones (Sandvig *et al.*, 2004).

L'ensemble de ces données montre que l'ischémie cérébrale est associée à la production de composés favorisant la neuroplasticité mais également de composés inhibant cette dernière. Ainsi, la cinétique et l'intensité de la production de ces composés détermineront la durée et l'importance de la restauration du réseau neuronal.

6) Angiogenèse

Il est nécessaire pour que les connections neuronales nouvellement formées soient pleinement fonctionnelles de les associer à un système vasculaire efficace. Par ailleurs, il a été constaté que la survie des patients est corrélée à la densité de microvaisseaux retrouvés en bordure de la zone lésée (Krupinski *et al.*, 1994). Ainsi, l'ischémie s'accompagne d'une stimulation des processus angiogéniques dans le but de revasculariser la pénombre ischémique et de réactiver les neurones survivants (Busch *et al.*, 2003). L'activation de l'angiogenèse au niveau de la lésion se traduit notamment par une augmentation de l'expression de VEGF et de ses récepteurs (Sun *et al.*, 2003b). Les études chez le rongeur ont également montré une prolifération des cellules endothéliales dès 12-24 h après l'induction de l'ischémie, cette prolifération continuant au delà de 21 j post-ictus (Hayashi *et al.*, 2003).

L'angiogenèse induite par le VEGF est associée à une vasodilatation médiée par le NO. Cette vasodilatation s'accompagne de l'extravasation de diverses protéines plasmatiques favorisant la migration des cellules endothéliales (Couffinhal *et al.*, 2001). Ainsi, les protéases de type PA ("plasminogene activator") et MMP, ainsi que les héparinases jouent un rôle très important en dégradant la MEC et en permettant la libération de facteurs comme le VEGF et TGF- β retenus dans cette matrice (Stetler-Stevenson, 1999). La MEC étant dégradée, les cellules endothéliales vont pouvoir s'y infiltrer et migrer en direction des tissus faiblement vascularisés. De nombreux facteurs agissent par chimiotactisme sur l'orientation du développement du réseau vasculaire. Ainsi, le VEGF, l'angiopoïétine-1, le FGF, le PDGF

("platelet derived growth factor") et les CAM favorisent la maturation et la stabilisation des vaisseaux. A l'opposé, l'angiostatine, l'endostatine, l'antithrombine III, l'interféron- β , le LIF ("leukemia inducible factor") et le PF-4 ("platelet factor 4") sont des inhibiteurs de l'angiogenèse (Couffinhal *et al.*, 2001). Les cellules endothéliales s'assemblent d'abord en tube plein qui acquiert par la suite une lumière. Le VEGF, l'angiopoïétine-1, les intégrines participent à la formation et à l'augmentation du diamètre de la lumière. La thrombospondine est quant à elle inhibitrice de la formation de la lumière des vaisseaux (Suri *et al.*, 1996).

En réponse à l'ischémie, on peut retrouver une augmentation de la synthèse de nombreux facteurs intervenant dans les processus angiogéniques. Ainsi, la synthèse de VEGF est augmentée aussi bien dans les astrocytes et les neurones que dans les cellules microgliales et les macrophages (Kovacs *et al.*, 1996). L'ischémie induit également une augmentation de PLGF ("placenta growth factor"), un facteur favorisant la mise en place des processus de l'angiogenèse et potentialisant l'activité du VEGF (Carmeliet *et al.*, 2001 ; Beck *et al.*, 2002). Parmi les autres facteurs connus pour jouer un rôle dans ce processus et qui voient leur synthèse augmentée suite à une ischémie, on peut citer : le PDGF qui favoriserait les interactions entre les cellules endothéliales et les péricytes (Renner *et al.*, 2003), l'EPO (Bernaudin *et al.*, 1999), la eNOS qui produit du NO intervenant dans la régulation de la pression sanguine et dans l'angiogenèse (Velkamp *et al.*, 2002), le TGF- β qui joue un rôle dans la prolifération et la différenciation de nombreux types cellulaires (Massague, 1990 ; Haqqani *et al.*, 2005) et le FGF qui favoriserait la prolifération des cellules endothéliales et l'élongation des vaisseaux (Chen *et al.*, 1994 ; Lin *et al.*, 1997). Finalement, il est important de souligner que les EPC ("endothelial progenitor cell") circulantes sont capables de rejoindre les sites de néovascularisation et de s'y différencier en cellules endothéliales, participant ainsi à l'angiogenèse (Asahara & Kawamoto, 2004). L'étude du taux d'EPC circulantes chez l'homme a ainsi révélé que ce taux était significativement augmenté chez les patients victimes d'un AVC. De façon intéressante, ce taux était inversement corrélé au déficit neurologique causé par l'AVC (Yip *et al.*, 2008).

Deuxième partie :
Matériels et Méthodes

I Techniques physiologiques

A Animaux

Les expériences ont été conduites chez le rat Wistar mâle (290–310 g, Depré) et ont été menées après validation des protocoles par le Comité d'Éthique de l'Expérimentation animale de l'Université de Bourgogne. Les animaux ont été hébergés à 5 par cage, la nourriture et l'eau étant données *ad libitum* et les rats maintenus sous un cycle jour/nuit constant de deux fois 12 h.

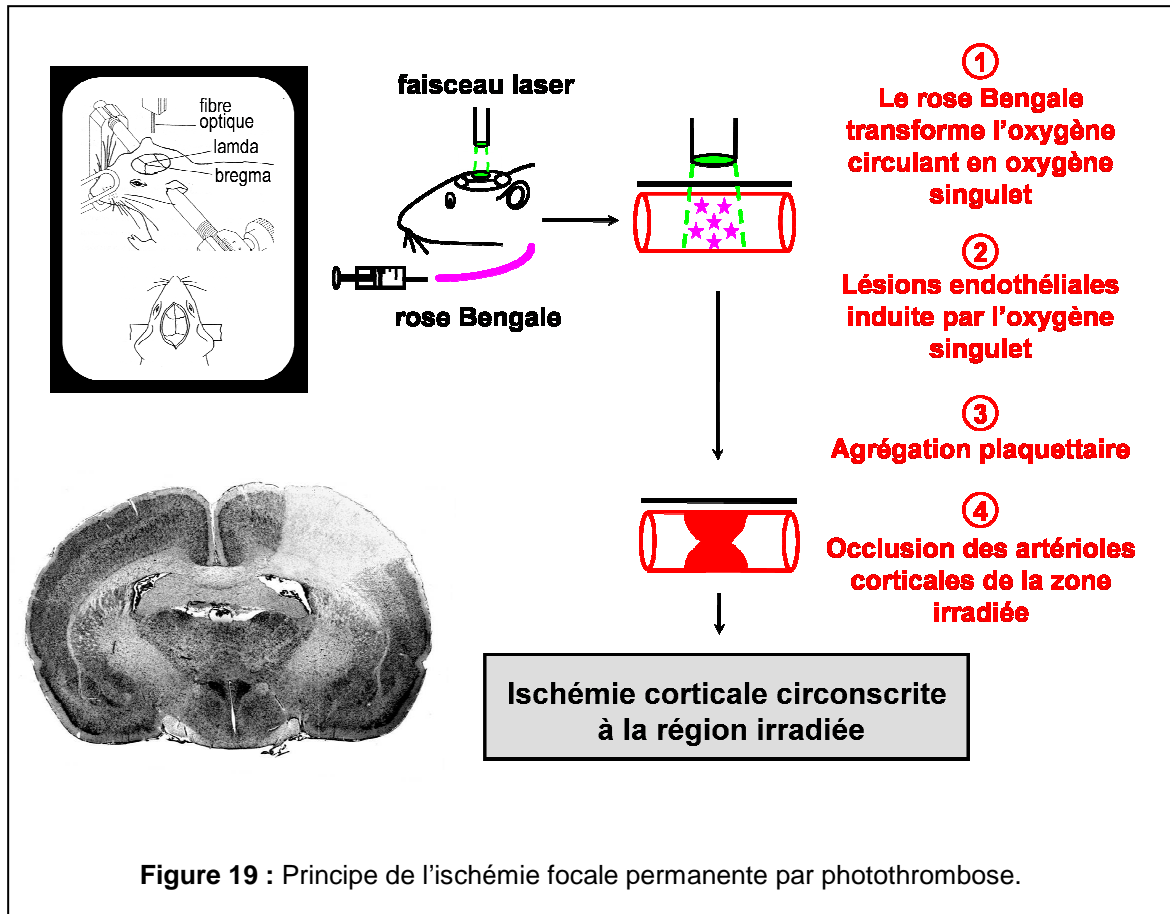
B Modèle d'ischémie focale permanente par photothrombose

1) Principe

Ce modèle d'ischémie focale permanente d'origine photothrombotique a initialement été décrit par Watson *et al.* (1985). Il a été modifié au sein de notre Laboratoire par Boquillon *et al.* (1992) en remplaçant la lampe à xénon utilisée dans l'étude originale par un faisceau laser, afin d'éviter un échauffement trop important du cerveau. Ce modèle consiste à administrer par voie systémique un colorant photosensible, le rose Bengale qui, une fois irradié par le faisceau laser, transfère de l'énergie à une molécule d'O₂, donnant naissance à l'oxygène singulet. Ce dernier induit des lésions endothéliales qui conduisent à la formation d'agrégats plaquettaires puis de thrombi vasculaires occlusifs au niveau de la zone irradiée. Il se développe alors un infarctus circonscrit au cortex qui atteint chez le Rat, son volume maximal en 24 h (Grome *et al.*, 1988 ; Norris *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 1996 ; Demougeot *et al.*, 2003). La figure 19 schématise le principe de ce modèle.

2) Réalisation de l'ischémie

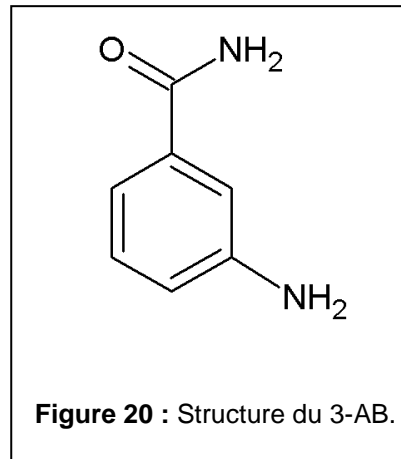
Après anesthésie à l'hydrate de chloral (400 mg/kg, 10 mL/kg, i.p., Sigma), l'animal est placé sur un appareil stéréotaxique (Kopf), la peau du crâne est incisée à l'aide d'un scalpel puis l'os du crâne est dégagé. La température corporelle est contrôlée et maintenue à 37 °C à l'aide d'un tapis chauffant (Harvard Apparatus). Le centre de la fibre optique est positionné 0,2 mm au dessus de l'os du crâne selon les coordonnées stéréotaxiques suivantes par rapport au bregma : antéropostérieur : -0,5 mm, latéral : 3,5 mm, le bregma et le lambda étant placés dans un plan horizontal.



La solution de rose Bengale (disodium tétraiodo-tétrachloro-fluorescéine, Aldrich) est diluée à 20 mg/mL dans du sérum physiologique (NaCl 0,9 %) puis filtré (0,22 μ m). Elle est ensuite perfusée (20 mg/kg, 1 mL/kg) à l'aide d'un pousse-seringue (Harvard Apparatus) pendant 20 s au moyen d'une aiguille placée dans la veine jugulaire. L'os du crâne est irradié par la source laser 1 min avant, pendant, et 5 min après la perfusion de rose Bengale. L'irradiation est réalisée à l'aide d'une source laser à 532 nm (LCS-DTL-312, Laser quantum) transmise par une fibre optique de diamètre 1 mm avec une puissance en sortie de fibre de 90 mW. Après suture des plaies, les animaux sont placés en cages individuelles avec libre accès à la nourriture et à la boisson.

C Traitement des animaux au 3 aminobenzamide (3-AB)

Le 3-AB (figure 20) est un inhibiteur compétitif des PARP. Il présente une spécificité plus forte pour la protéine PARP-1 que pour les autres PARP. Il possède une efficacité à des doses de l'ordre du mg/kg chez l'animal qui correspondent à une concentration de l'ordre du μ M au niveau cérébral (Cosi *et al.*, 1996).



Les animaux sont traités par le 3-AB (Sigma) à la dose de 90 mg/kg administré par voie i.p. à raison de 10 mL/kg juste après l'irradiation au laser. Une solution de 3-AB à une concentration de 1 mg/ μ L est tout d'abord préparée par dissolution de l'inhibiteur dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) absolu (Sigma). Cette solution est ensuite diluée au $1/100$ dans du sérum physiologique. Les animaux ne recevant pas le 3-AB (lot véhicule) sont traités par voie i.p. avec une solution de DMSO dilué au $1/100$ dans du sérum physiologique, à raison de 10 mL/kg juste après l'irradiation au laser.

D Rinçage des cerveaux par voie transcardiaque

Après anesthésie des animaux au chloral (400 mg/kg, 10 mL/kg, i.p) et ouverture de la cage thoracique, le cœur est coupé au niveau de l'apex et une canule métallique est introduite dans le ventricule gauche jusque dans l'aorte. Après incision de l'oreillette droite, le cerveau est perfusé par du NaCl 0,9 % sous une pression de 110 cm d'eau jusqu'à élimination complète du sang. Après 10 min de perfusion, soit environ 200 ml de NaCl, la canule est retirée et le cerveau est rapidement extrait de la boîte crânienne.

E Prélèvement des tissus cérébraux

Une fois rincés et prélevés, les cerveaux sont immédiatement posés sur une plaque réfrigérée. Après élimination du cervelet, les deux hémisphères sont séparés à l'aide d'un scalpel pour en extraire l'hippocampe puis le cortex. Chaque cortex est alors étalé sur la plaque afin de réaliser à l'aide d'emportes pièces de diamètre croissant les différents prélèvements corticaux (punch P1 et P2) sur l'hémisphère droit irradié et au niveau de la région homotopique de l'hémisphère gauche non irradié (figure I-1).

Le premier punch (P1) de diamètre 4,6 mm est centré sur la lésion qui est visible à l'œil nu, puis le second punch (P2) de diamètre 9,5 mm est prélevé de manière équivalente. Le diamètre des punches a préalablement été déterminé au laboratoire à partir du volume de l'infarctus obtenus au temps 24 h. A ce temps, la taille de la lésion est maximale, P1 correspondant uniquement à du tissu infarci et P2 à du tissu périlésionnel (Van hoecke *et al.*, 2006). Aux autres temps (4 h, 8 j, 15 j et 30 j), P1 correspond, à la fois, à du tissu infarci et périlésionnel et P2 correspond toujours à la zone périlésionnelle.

II Techniques biochimiques

Sauf indications contraires, les réactifs utilisés proviennent de chez Sigma-Aldrich et de chez BioRad pour la technique du Western blot.

A Extraction des protéines

Les prélèvements cérébraux sont homogénéisés dans 7 volumes de tampon de lyse [Tris 50 mM, NaCl 150 mM, acide tétraacétique d'éthylène glycol (EGTA) 1 mM, triton X-100 1 %] additionné d'inhibiteurs de protéases*. Les tissus sont broyés à l'aide de potters adaptés à la taille des tubes Eppendorfs tout en étant maintenus dans la glace. L'extrait est ensuite soumis à des ultrasons pendant 20 s, puis centrifugé à 12000 g (3K30, Sigma) pendant 10 min à 4 °C. Le surnageant est finalement aliquoté puis conservé à -80 °C.

* : Inhibiteur de protéases (P8340, Sigma) contenant : AEBSF (4-(2-aminoéthyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride), aprotinine, bestatine hydrochloride, E-64 (N-(trans-epoxysuccinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide), hémisulfate leupeptine et pepstatine A (Sigma P8340).

B Dosage des protéines

1) Principe

Le dosage a été réalisé par la technique de l'acide bicinchoninique (BCA). Le BCA détecte les ions Cu^+ provenant de la réduction des ions Cu^{2+} par les protéines en milieu alcalin. Le produit de réaction formé, de couleur violette, provient de la chélation d'un ion Cu^+ par deux molécules de BCA (Smith *et al.*, 1985).

2) Protocole

Un dépôt de 25 µL de chaque extrait cérébral dilué au $1/10$ dans le tampon d'extraction est effectué en duplicate sur une plaque 96 puits. Une gamme étalon est également déposée sur la plaque. Elle est réalisée par dilution en cascade d'une solution de BSA (Bovin serum albumine, A8022 Sigma) à 4 mg/mL. Dans tous les puits sont ajoutés 200 µL de réactif (50v de réactif A pour 1v de réactif B) (FT-40840A Uptima, Interchim). Les plaques sont incubées à 37 °C pendant 20 min puis la DO est mesurée à 544 nm au moyen d'un lecteur de microplaque (UVM340 Asys, Biochrom).

C Technique de Western Blotting

1) Principe

La technique de Western Blotting est une technique semi quantitative permettant d'étudier l'expression d'une protéine spécifique. Les protéines sont tout d'abord séparées en fonction de leur taille à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'acrylamide, puis elles sont transférées sur une membrane où elles sont mises en évidence de manière spécifique à l'aide d'anticorps. La révélation est enfin réalisée par chimioluminescence (figure 21). Cette technique a été utilisée pour étudier l'expression des protéines GAP-43 (marqueur de la croissance axonale), synaptophysine (marqueur de la synaptogenèse), BDNF et β -actine. Les conditions expérimentales spécifiques à chaque protéine d'intérêt sont résumées dans le tableau 1.

2) Electrophorèse

Les protéines totales sont séparées selon la technique de Laemmli (1970) sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE). Le SDS est un puissant détergent anionique qui se lie aux protéines dénaturées pour former un complexe SDS-protéines chargé négativement. La quantité de SDS qui se lie est proportionnelle à la masse moléculaire des protéines mais est indépendante de leur séquence.

Le système électrophorétique utilisé est discontinu. Les protéines sont d'abord concentrées dans un gel de concentration, puis séparées selon leur masse moléculaire dans le gel de séparation (dont la composition est fonction de la protéine étudiée). Les gels sont des gels de polyacrylamide (mélange acrylamide/N,N'-méthylène-bisacrylamide) constitués de chaînes polymérisées d'acrylamide reliées par un agent bifonctionnel : le bisacrylamide qui confère au gel sa rigidité et permet la formation d'un réseau au travers duquel les complexes

SDS-protéines migrent. Ainsi, les gels de séparation avec une faible concentration d'acrylamide permettent une bonne séparation des protéines de forte masse moléculaire, alors que les gels dont la concentration en acrylamide est élevée séparent avec une bonne résolution les protéines de faible masse moléculaire. Dans ce cas, les protéines de forte masse moléculaire restent à l'extrémité supérieure, près de la zone de dépôt du mélange. Pour réaliser le Western blotting, le système MINI-PROTEAN Tetra cell de BioRad a été utilisé.

a/ Préparation des gels

Pour la réalisation de ces gels, le tampon Tris (Tris 0,5 M, SDS 0,4 %, pH 6,8 pour le gel de concentration et Tris 1,5 M, SDS 0,4 %, pH 8,8 pour le gel de séparation) et la solution stock d'acrylamide/N,N'-méthylène-bisacrylamide à 40 % sont mélangés dans des proportions permettant d'obtenir un gel à la concentration souhaitée (4 à 16 %). La polymérisation des gels est réalisée par addition de 0,2 % de persulfate d'ammonium et de 0,1 % de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine.

b/ Préparation des échantillons à déposer

Une fraction aliquote correspondant à une quantité de 5 à 60 µg de protéines totales est diluée à part égale dans du tampon dénaturant de Laemmli 2X additionné de β-mercaptoéthanol 10 % (Tris 125 mM, SDS 4 %, glycérol 10 %, bleu de bromophénol 0,002 %, pH 6,8). Les échantillons sont ensuite ramenés à un volume identique avec du Laemmli 1X, puis dénaturés par chauffage à 85 °C (SBH130, Stuart) pendant 10 min.

c/ Migration

Le système contenant le gel de polyacrylamide est introduit dans la cuve à électrophorèse. Les puits délimités par le peigne au niveau du gel de concentration sont lavés afin d'éliminer la solution de polyacrylamide non polymérisée. Les échantillons ainsi qu'un standard coloré de masses moléculaires sont déposés dans les puits pouvant contenir un volume maximal de 40 µL. La cuve est alors remplie de tampon de migration Tris/Tricine/SDS 1X (Tris 100 mM, Tricine 100 mM, SDS 0,1 %, pH 8,3). L'électrophorèse est effectuée sous un courant constant d'ampérage variable en fonction de la protéine étudiée jusqu'à ce que le front de migration atteigne l'extrémité inférieure du gel.

d/ Transfert

Après la migration électrophorétique, une réplique du gel de polyacrylamide est réalisée par transfert des protéines (effet buvard ou blotting) sur une feuille de polyvinylidènefluoride (PVDF, 0,2 µm) préalablement imbibée par le tampon de transfert (Carbonate : NaHCO₃ 10 mM, Na₂CO₃ 3 mM, méthanol 20 %, pH 9,9). Le transfert s'effectue pendant 2 h sous ampérage constant (200 mA).

e/ Immunoblotting / Révélation

Toutes les étapes décrites ci-dessous sont réalisées en présence de tampon TBS (Tris buffered saline) (Tris 50 mM, NaCl 138 mM, KCl 2,7 mM, pH 8) contenant 0,1 % de Tween-20 (TBS-T).

A la fin du transfert, la membrane de PVDF est incubée dans du TBS-T contenant 5 % de lait écrémé afin de limiter les fixations non spécifiques. Après 3 rinçages de 10 min dans le TBS-T, la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire. A la fin de l'incubation, la membrane est à nouveau lavée 3 fois et incubée en présence de l'anticorps secondaire pendant 2 h. Après 3 lavages de 10 min dans le TBS-T, les complexes anticorps-antigènes sont révélés par une réaction de chimiluminescence à l'aide du kit ECL⁺ (enhanced chimioluminescence plus, GE Healthcare).

La révélation repose sur la formation d'un ester d'acridinium, qui est un intermédiaire nécessaire à la formation d'un composé capable d'émettre de la lumière lors de sa désexcitation. En présence de peroxyde d'hydrogène, le Lumigen PS-3 Acridan est oxydé en esters d'acridinium par la HRP ("horseradish peroxydase") conjuguée à l'anticorps secondaire. Les esters d'acridinium formés sont ensuite dégradés en milieu légèrement alcalin en un composé excité qui émet de la lumière lors de son retour à un état fondamental. La quantité de lumière émise est proportionnelle à l'activité peroxydase et donc à la quantité de protéines présentes dans l'extrait étudié.

Toutes les opérations suivantes sont réalisées en chambre noire. La membrane de PVDF est incubée pendant 5 min avec les réactifs du système ECL⁺ à raison de 0,1 mL/cm² de membrane. La membrane est alors rapidement séchée afin d'éliminer l'excès de réactifs de détection, puis est enveloppée dans un film alimentaire (Saran Wrap) afin d'éviter le contact direct avec le film (hyperfilm ECL 289 06835, GE Healthcare). Après 1 à 5 min d'exposition dans une cassette, le film est développé dans le révélateur (AL-4, Kodak), puis baigné dans un bain de fixateur (LX-24, Kodak), rincé à l'eau courante puis séché.

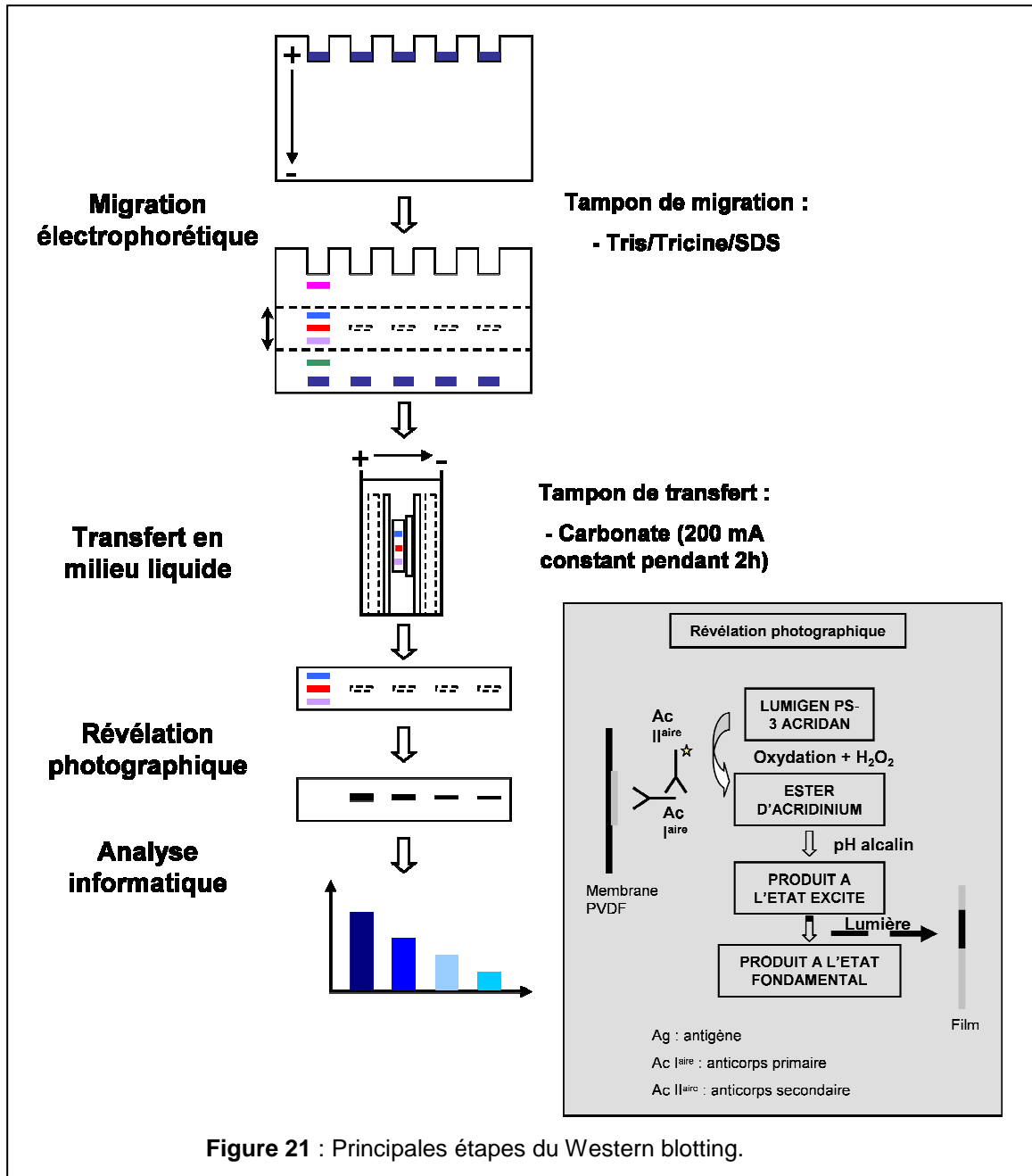
3) Analyse

L'acquisition des films est réalisée à l'aide d'un scanner (Snapscan 1212U, Agfa) et la quantification des bandes d'expressions protéiques à l'aide du logiciel Scion Image (NIH, USA). L'expression des protéines est rapportée pour chaque échantillon à l'expression d'une protéine témoin : la β -actine. Les résultats obtenus correspondent à l'expression de la protéine d'intérêt en unités arbitraires.

Tableau 1 : Conditions expérimentales utilisées pour la technique de Western blotting.

| Protéine étudiée | GAP-43 | Synaptophysine | BDNF | β-actine |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Masse moléculaire | 43 kDa | 38 kDa | 14 kDa | 42 kDa |
| Quantité de protéine totale déposée | 40 μ g | 5 μ g | cortex : 60 μ g hp : 30 μ g | - |
| % du gel de séparation | 12 % | 12 % | 16 % | - |
| Dénaturation | 5 % β -ME 10 min à 85 °C | 5 % β -ME 10 min à 85 °C | 5 % β -ME 10 min à 85 °C | - |
| Tampon de migration | Tris/Tricine/SDS | Tris/Tricine/SDS | Tris/Tricine/SDS | - |
| Migration | 10 mA dans GC 20 mA dans GS | 10 mA dans GC 20 mA dans GS | 10 mA dans GC 10 mA dans GS | - |
| Tampon de transfert | Carbonate | Carbonate | Carbonate | - |
| Transfert | 2 h à 200 mA | 2 h à 200 mA | 2 h à 200 mA | - |
| Saturation | Régilait à 5 % ON à 4 °C | Régilait à 5 % ON à 4 °C | Régilait à 5 % 1 h TA | Régilait à 5 % ON à 4 °C |
| Anticorps primaire | Zymed Laboratories 33-5000 <i>mouse</i> | Thermo Fisher Scientific RB-1461-P0 <i>rabbit</i> | Epitomics 3160-1 <i>rabbit</i> | Sigma A5441 <i>mouse</i> |
| Dilution / Incubation | $1/2000$ 3 h TA | $1/2000$ 3 h TA | $1/2000$ ON à 4 °C | $1/5000$ 3 h TA |
| Anticorps secondaire couplé à la HRP | Jackson ImmunoResearch 115-035-166 <i>Anti-mouse</i> | Jackson ImmunoResearch 115-035-045 <i>Anti-rabbit</i> | Jackson ImmunoResearch 115-035-045 <i>Anti-rabbit</i> | Jackson ImmunoResearch 115-035-166 <i>Anti-mouse</i> |
| Dilution / Incubation | $1/80000$ 2 h TA | $1/80000$ 2 h TA | $1/30000$ 2 h TA | $1/80000$ 2 h TA |

(hp : hippocampe, GC : Gel de concentration, GS : Gel de séparation, HRP : Horseradish peroxydase, β -ME : Béta mercaptoéthanol, ON : Overnight, TA : Température ambiante)



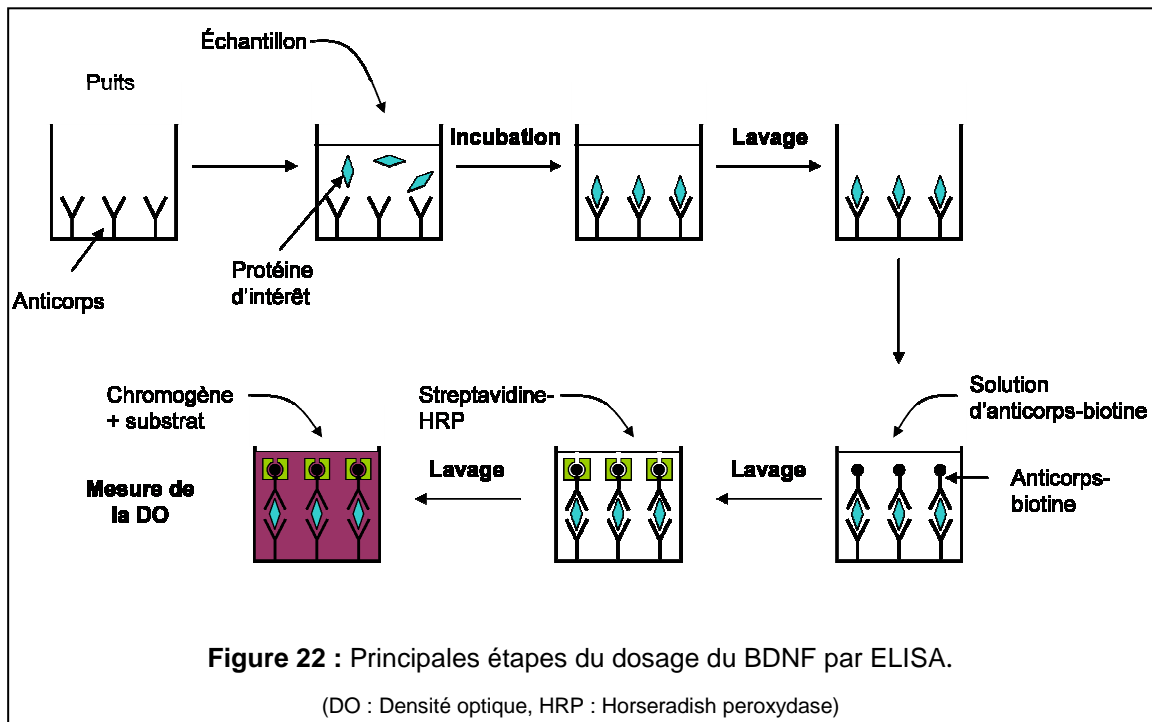
D Méthode immuno-enzymatique ELISA

1) Principe

D'une manière générale, les techniques ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) sont des méthodes immunoenzymatiques sur support solide qui permettent de détecter voire de doser un antigène ou un anticorps donné dans un échantillon biologique (tissus ou sérum).

Dans notre étude, la technique a été utilisée pour doser le BDNF cérébral à l'aide d'un kit ELISA (CYT306, Chemicon) dont le principe, détaillé à la figure 22, est le suivant : les échantillons sont ajoutés dans des puits préalablement tapissés d'anticorps de capture

spécifiquement dirigé contre l'antigène recherché, ici anti-BDNF. Après rinçages des puits, le BDNF lié à l'anticorps de capture est mis en évidence à l'aide d'un anticorps de détection biotinylé anti-BDNF reconnaissant un autre épitope de l'antigène recherché. Le sandwich formé est alors incubé en présence d'un complexe streptavidine conjugué à l'HRP qui va être révélé par l'ajout d'un chromogène et de son substrat.



2) Protocole

Les solutions de dilution, de lavage, de révélation et de blocage sont fournies par le fabricant et leur composition exacte ne nous est pas donnée. Les extraits protéiques sont dilués au $1/10$ dans du tampon de lyse utilisé pour l'extraction des protéines et 50 μL d'échantillon dilué sont déposés dans les puits d'une plaque de microtitration 96 puits (en duplicat) où sont ajoutés 50 μL de solution de dilution contenant 2 % de BSA. Parallèlement, une gamme étalon est réalisée à partir d'une solution standard de BDNF (en duplicat, gamme de 0 à 120 pg/mL). Les échantillons sont incubés toute la nuit à 4 °C sous agitation lente. Les puits sont ensuite lavés 4 fois à l'aide de 250 μL de tampon de lavage, puis incubés 3 h, à température ambiante sous agitation lente, avec 100 μL d'anticorps biotinylé anti-BDNF dilué au $1/1000$. Les puits sont à nouveau rincés, et 100 μL de solution de streptavidine-HPR diluée au $1/1000$ sont additionnés dans chaque puits. Après 1 h d'incubation à température ambiante sous agitation, les puits sont rincés comme précédemment et 100 μL de solution contenant le substrat et le chromogène TMB (3,3',5,5' tétraméthylbenzidine) sont ajoutés dans chaque

puits. La réaction est stoppée au bout de 15 min par l'ajout de 100 µL de solution acide de blocage et la DO est lue à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (UVM340 Asys, Biochrom).

III Techniques histologiques

A Fixation et coupes des cerveaux

Après rinçage des cerveaux par voie transcardiaque par du sérum physiologique (cf : § : I.D), 150 mL de solution fixatrice de paraformaldéhyde (PFA) à 4 % dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,084 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,016 M) sont perfusés. Après extraction de la boîte crânienne, les cerveaux sont placés dans la solution de PFA pendant 1 h puis dans une solution de sucrose à 20 % dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M pour une durée de 48 h. Finalement, les cerveaux sont congelés dans l'isopentane à -40 °C et stockés à -80 °C.

Les cerveaux sont coupés transversalement en section de 20 µm d'épaisseur sur toute la longueur de la lésion ainsi qu'au niveau de l'hippocampe à l'aide d'un cryostat (HM550, Microm) à -20 °C. Les coupes sont montées sur des lames de verre (Superfrost⁺) et stockées à -80 °C. Elles sont ensuite utilisées pour la détermination du volume de l'infarctus, l'étude de la mort cellulaire et l'immunohistofluorescence.

B Détermination du volume de l'infarctus

Le volume de l'infarctus a été mesuré sur les coupes de cerveau congelées colorées au crésyl violet, qui marque principalement la chromatine (ADN) et les corps de Nissl (ARN). Les tissus morts apparaissent donc incolores.

1) Coloration des coupes au crésyl violet

Les coupes sont tout d'abord plongées dans un bain de fixateur (Liquide de Carmoy : éthanol absolu/chloroforme/acide acétique, 6v/3v/1v) pendant 10 min. Elles sont ensuite plongées 8 min dans le bain de colorant (solution d'acétate de crésyl violet diluée à 0,4 % dans un mélange d'acétate de sodium anhydre (9v) et d'acide acétique (11v), et filtrée sur papier Whatman), rincées dans l'eau distillée, puis déshydratées dans différents bains

d'éthanol avant d'être placées dans un bain de toluène jusqu'au montage entre lame et lamelle à l'aide d'un baume d'inclusion (Eukitt, O'Kindler). Les différentes étapes du protocole sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Coloration des coupes cérébrales au crésyl violet.

| Liquide de Carmoy | Crésyl violet | Eau distillée | Éthanol à 70 % | Éthanol à 95 % | Éthanol absolu | Toluène |
|-------------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|---------|
| 10 min | 8 min | 20 s | 20 s | 20 s | 1 min | > 10 s |
| Montage entre lame et lamelle | | | | | | |

2) Calcul du volume de la lésion

Le volume de la lésion est calculé après détermination, pour chacune des coupes prélevées tous les 200 μm , de la surface de la lésion (SL). La mesure des surfaces est réalisée grâce au logiciel Scion Image (NIH, USA) et le volume de la lésion est extrapolé à l'aide de la formule suivante :

$$V = \frac{1}{2} \times d \times \left(S_1 + S_n + \sum_2^{n-1} (S) \right)$$

d = distance entre 2 mesures, S = surface de la lésion

C Double coloration à la fuchsine acide et au bleu de Toluidine

1) Principe

Cette double coloration permet de distinguer les cellules acidophiles qui ont perdu leur intégrité membranaire, colorées en rose vif par la fuschine acide, des cellules basophiles dont les noyaux et le contenu acide sont colorés en bleu. Dans le cas de la mort cellulaire, les cellules nécrotiques apparaissent donc colorées en rose alors que les cellules apoptotiques apparaissent colorées en bleu.

2) Protocole

Les coupes sont tout d'abord plongées dans une solution de fuchsine acide à 1% pendant 5 s puis elles sont rincées pendant 55 s dans un bain d'eau distillée où elles sont soumises à une agitation douce. Les coupes sont ensuite colorées pendant 10 min dans un bain de bleu de Toluidine à 1 %. Elles sont rincées dans l'eau distillée puis déshydratées dans différents bains d'éthanol. Les coupes sont finalement plongées dans du toluène puis montées

avec du milieu d'inclusion. Les différentes étapes du protocole sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Double coloration des coupes à la fuchsine acide et au bleu de Toluidine.

| Fuchsine acide | Eau distillée | Bleu de Toluidine | Éthanol à 95 % | Éthanol absolu | Toluène |
|-------------------------------|---------------|-------------------|----------------|----------------|---------|
| 5 s | 55 s | 10 min | 30 s | 30 s | 30 s |
| Montage entre lame et lamelle | | | | | |

D Immunohistofluorescence

1) Principe

L'immunohistofluorescence est une technique basée sur l'utilisation d'anticorps pour localiser à l'échelle cellulaire une protéine sur une coupe tissulaire. Les coupes de tissus sont tout d'abord incubées en présence d'un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt. Un anticorps secondaire dirigé contre l'espèce d'où est issu l'anticorps primaire et couplé à un fluorochrome est ensuite ajouté. Après montage des coupes, la localisation de la protéine d'intérêt est analysée à l'aide d'un microscope à fluorescence.

Dans le but d'identifier le type cellulaire exprimant l'antigène recherché, des protocoles de double immunohistofluorescence ont été développés. Ils consistent en une incubation de deux anticorps primaires, l'un reconnaissant l'antigène d'intérêt recherché (PAR et BDNF), l'autre un antigène spécifiquement exprimé par un type cellulaire donné. La révélation nécessite alors l'utilisation d'anticorps secondaires conjugués à deux fluorochromes différents. Dans notre étude, différents anticorps ont été utilisés pour identifier respectivement, la microglie (anticorps anti-OX-42 ("orexin 42") ou anti-ED1), les neurones (anticorps anti-NeuN ("neuronal nuclei")) et les astrocytes (anticorps anti-GFAP).

2) Protocole

Après décongélation et séchage des lames (37 °C pendant 1 h), les coupes tissulaires sont délimitées à l'aide d'un stylo hydrophobe (S2002 Dako). Les sections sont réhydratées dans du tampon PBS (Phosphate buffer saline, 10 mM, pH 7,4) pendant 1 h puis incubées 2 h en présence d'une solution de PBS contenant du sérum de chèvre (GS, G9023, Sigma) à 10 % et du Tween 20 à 0,3 % afin de bloquer les sites de fixation aspécifiques et de perméabiliser les membranes des cellules aux anticorps. Les coupes utilisées pour l'étude de la localisation du BDNF sont préalablement traitées à la protéinase K (P6556, Sigma, 10 µg/mL) pendant

10 min puis rincées avec du PBS pendant 10 min. Les lames sont ensuite incubées en présence de l'anticorps primaire seul ou du mélange d'anticorps primaires dirigés contre les protéines étudiées (voir le tableau 4 pour les différentes conditions expérimentales utilisées). Les coupes sont ensuite rincées 3 fois 10 min dans du tampon PBS et incubées 3 h à température ambiante et à l'abri de la lumière en présence des anticorps secondaires spécifiques aux anticorps primaires utilisés (voir tableau 4). Finalement, les sections sont rincées 3 fois 10 min dans du tampon PBS puis fixées avec un milieu de montage entre lame et lamelle (Sigma F4680). Les lames ont été observées et photographiées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse E600) couplé à une caméra d'acquisition.

Tableau 4 : Conditions expérimentales utilisées pour l'immunohistofluorescence.

| Protéine étudiée | BDNF | ED-1 | GFAP | NeuN | OX-42 | PAR |
|----------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Anticorps primaire | Millipore AB5613 rabbit | AbD Serotec MCA341R mouse | Sigma G3893 mouse | Millipore MAB377 mouse | AbD Serotec MCA275R mouse | Calbiochem 528815 rabbit |
| Dilution /Incubation | $1/100$ 72 h à 4 °C | $1/150$ ON à 4 °C | $1/200$ 72 h à 4 °C | $1/200$ 72 h à 4 °C | $1/150$ ON à 4 °C | $1/250$ ON à 4 °C |
| Anticorps secondaire | Invitrogen Alexa Fluor 568 A11036 Anti rabbit | Invitrogen Alexa Fluor 488 A11029 Anti mouse | Invitrogen Alexa Fluor 488 A11029 Anti mouse | Invitrogen Alexa Fluor 488 A11029 Anti mouse | Invitrogen Alexa Fluor 488 A11029 Anti mouse | Invitrogen Alexa Fluor 568 A11036 Anti rabbit |
| Dilution /Incubation | $1/1000$ 2 h | $1/1000$ 2 h | $1/1000$ 2 h | $1/1000$ 2 h | $1/1000$ 2 h | $1/1000$ 2 h |

(ON : over night)

IV Analyses statistiques des résultats

Les valeurs indiquées représentent les moyennes affectées de leur erreur standard moyenne (SEM) obtenues dans des groupes de 5 à 11 animaux. L'analyse statistique a été réalisée grâce aux tests non-paramétriques de Kruskal-Wallis, suivi du test de Mann-Whitney. Pour toutes les comparaisons effectuées, le seuil de signification du test est fixé à $p < 0,05$.

Troisième partie :
Résultats et Discussion

I Première étude : Implication de la microglie dans les changements neuroplastiques accompagnant une ischémie focale chez le Rat.

Référence : Madinier A, Bertrand N, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Beley A, Marie C & Garnier P (2009) Microglial Involvement in Neuroplastic Changes Following Focal Brain Ischemia in Rats. PLoS ONE 4(12): e8101. doi:10.1371/journal.pone.0008101

A Résumé

1) Objectif de l'étude

Notre objectif a été de mettre en évidence une relation entre l'activation microgliale et la mise en place des mécanismes de neuroplasticité post-ischémiques. Dans ce but, nous avons étudié chez le rat les effets d'une réduction de la réponse microgliale induite par une ischémie focale par photothrombose sur l'expression de marqueurs de la neuroplasticité. La modulation de l'activation microgliale a été obtenue en inhibant PARP-1 par une injection post-ischémique de 3-AB à la dose de 90 mg/kg. Dans ce travail, le volume de la lésion, l'activité de PARP-1, la réponse inflammatoire microgliale et l'expression de la synaptophysine et de GAP-43 ont été étudiés à différents temps post-ischémiques (4 h, 24 h, 8 j, 15 j et 30 j).

2) Principaux résultats

Nos résultats montrent que dans nos conditions expérimentales, l'ischémie cérébrale induit une augmentation précoce de l'activité de poly(ADP-ribosyl)ation (4 h et 24 h) tant au niveau neuronal que microglial. Même si l'ischémie s'accompagne également d'une activation rapide (dès 4h) de la microglie au niveau de la lésion corticale, les cellules microgliales activées ne développent une activité phagocytaire qu'à partir de 8 j post-ictus. Enfin, une augmentation de l'expression des marqueurs de synaptogenèse (synaptophysine) et pousse axonale (GAP-43) est observée au niveau de la lésion aux différents temps longs (8 j, 15 j et 30 j).

Nos résultats indiquent que le traitement par le 3-AB induit à la fois une diminution de l'activité de poly(ADP-ribosyl)ation et une réduction de l'activation précoce de la microglie, sans que celles-ci soient associées à une diminution du volume de l'infarct, index de

neuroprotection. En revanche, l'inhibition précoce de la réponse microgliale s'accompagne d'une diminution de l'expression des marqueurs de plasticité neuronale aux temps longs.

L'ensemble de ces résultats fournit des arguments en faveur d'une participation des cellules microgliales au déclenchement des mécanismes de la neuroplasticité post-ischémique.

B Publication

Microglial Involvement in Neuroplastic Changes Following Focal Brain Ischemia in Rats

Alexandre Madinier^{1,2}, Nathalie Bertrand^{1,2,3}, Claude Mossiat^{1,2}, Anne Prigent-Tessier^{1,2}, Alain Beley^{2,3}, Christine Marie^{1,2}, Philippe Garnier^{1,2,3*}

1 Unité INSERM U887 Motricité-Plasticité, Dijon, France, **2** Université de Bourgogne, Dijon, France, **3** Département Génie Biologique, IUT, Dijon, France

Abstract

The pathogenesis of ischemic stroke is a complex sequence of events including inflammatory reaction, for which the microglia appears to be a major cellular contributor. However, whether post-ischemic activation of microglial cells has beneficial or detrimental effects remains to be elucidated, in particular on long term brain plasticity events. The objective of our study was to determine, through modulation of post-stroke inflammatory response, to what extent microglial cells are involved in some specific events of neuronal plasticity, neurite outgrowth and synaptogenesis. Since microglia is a source of neurotrophic factors, the identification of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as possible molecular actor involved in these events was also attempted. As a means of down-regulating the microglial response induced by ischemia, 3-aminobenzamide (3-AB, 90 mg/kg, i.p.) was used to inhibit the poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1). Indeed, PARP-1 contributes to the activation of the transcription factor NF- κ B, which is essential to the upregulation of proinflammatory genes, in particular responsible for microglial activation/proliferation. Experiments were conducted in rats subjected to photothrombotic ischemia which leads to a strong and early microglial cells activation/proliferation followed by an infiltration of macrophages within the cortical lesion, events evaluated at serial time points up to 1 month post-ictus by immunostaining for OX-42 and ED-1. Our most striking finding was that the decrease in acute microglial activation induced by 3-AB was associated with a long term down-regulation of two neuronal plasticity proteins expression, synaptophysin (marker of synaptogenesis) and GAP-43 (marker of neuriteogenesis) as well as to a significant decrease in tissue BDNF production. Thus, our data argue in favour of a supportive role for microglia in brain neuroplasticity stimulation possibly through BDNF production, suggesting that a targeted protection of microglial cells could represent an innovative approach to potentiate post-stroke neuroregeneration.

Citation: Madinier A, Bertrand N, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Beley A, et al. (2009) Microglial Involvement in Neuroplastic Changes Following Focal Brain Ischemia in Rats. PLoS ONE 4(12): e8101. doi:10.1371/journal.pone.0008101

Editor: Colin Combs, University of North Dakota, United States of America

Received: August 7, 2009; **Accepted:** November 5, 2009; **Published:** December 1, 2009

Copyright: © 2009 Madinier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the Conseil Régional de Bourgogne, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pgarnier@u-bourgogne.fr

Introduction

The pathogenesis of ischemic stroke is a complex sequence of events including inflammatory reaction. Extensively studied over the last decade, this phenomenon is characterized by the involvement of several central and peripheral cell types as well as a large number of inflammatory molecules [1–3]. Post-ischemic inflammation includes the infiltration of polymorphonuclear granulocytes, monocytes/macrophages into the injured brain and the activation of astrocytes and microglia. Among these cells, it is now well admitted that microglia appears to be a major cellular contributor of post-ischemic inflammation [4]. After focal ischemia, reactive microgliosis is characterized by a specific chronology which includes a rapid microglial activation followed by a massive expansion and migration of the resident microglial cells. Several studies have shown that this initial intrinsic response is followed by the recruitment of blood-born macrophages which migrate after a delay of several days into the neuronal parenchyma [5–7].

Whether microglial activation has beneficial or detrimental effects on adjacent neuronal population is still controversially

discussed [8–10]. It has been proposed that these cells, through the release of several harmful components such as IL-1 β , TNF- α , proteases and ROS species [11–14] can affect neuronal function and promote neurotoxicity [1,11,15]. In addition, reducing inflammatory response and microglial activation has conferred neuroprotection in various models of neurodegeneration [16,17] and has been shown to interfere with neurogenesis [18,19]. On the other hand, there are also growing evidences showing that under certain circumstances, microglia could be neuroprotective [20–22] and could also promote adult neurogenesis [23,24]. Indeed, microglia has been shown to be neurosupportive by the uptake of glutamate [25], the removal of cell debris [26] and recently by the engulfment of polymorphonuclear neutrophils [27]. In addition, beyond this scavenger function, several evidences have demonstrated that once activated or in proliferation, microglial cells are also an important cellular source for the production of neurotrophic factors such as IGF-1 [22,24] and BDNF [28]. Concerning this latter, evidences showing microglia as a source of BDNF have been reported in *in vitro* studies [29] and after CNS injuries such as traumatic brain injury [30] and striatal lesion [28]. To the best of our knowledge, there are surprisingly no data

identifying microglia expressing BDNF after *in vivo* models of focal ischemia although this trophic factor has been designated to play a central role in the CNS, as neuroprotective [31,32] and essential to the stimulation of brain plasticity [33–35].

Thus, despite important progress in the understanding of microglial activation, proliferation, phagocytosis function, cytokines and growth factors production, the exact role of microglia is still unclear. Even though several studies have been performed in order to determine the function of these cells in neurogenesis [10], little is known concerning the role of microglia in other long term post-stroke brain plasticity events. In this context, the objective of our study was to determine through modulation of inflammatory response, to what extent microglial cells are involved in some specific events of neuronal plasticity such as neurite outgrowth and synaptogenesis. In addition, the identification of the neurotrophin BDNF as possible molecular actor involved in these events was attempted following ischemic injury. For this purpose, rats were subjected to a photothrombotic ischemic stroke which is associated with a strong and early microglial cells activation/proliferation within the cortical lesion. The modulation of the inflammatory response was performed by using a poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitor [3-aminobenzamide (3-AB), 90 mg/kg, i.p.]. Indeed, beside its function in DNA repair and its well established participation in cell death through extensive activation after stroke [36], PARP-1 has been shown to contribute to the activation of transcription factors, among them the most important NF- κ B that has been designated to be essential to the upregulation of proinflammatory genes and to lead to microglial activation/proliferation [37,38]. Activated microglia was evaluated at serial time points up to 1 month after ischemia by immunostaining for OX-42 and ED-1. In parallel, the long term expression of two neuronal plasticity proteins, GAP-43 as a marker of neuritogenesis and synaptophysin as a marker of synaptogenesis as well as the tissue production and cellular localization of BDNF were also analyzed.

Materials and Methods

Materials

3-Aminobenzamide (3-AB), protease inhibitor cocktail, phosphate buffered saline (PBS), tris buffered saline (TBS) and all other reagent grade chemicals were purchased from Sigma (Saint Quentin-Fallavier, France). Acrylamide and bis-acrylamide, sodium dodecyl-sulfate (SDS) and tween-20 were obtained from Bio-Rad (Ivry sur Seine, France). The polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were purchased from GE Healthcare (Orsay, France). The rabbit polyclonal antibody raised against synaptophysin (RB-1461-P) and the mouse monoclonal antibody recognizing rat GAP-43 (Zymed 33–5000) were purchased respectively from Interchim (Montluçon, France) and Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). The mouse monoclonal CD11b (OX-42) that recognizes type 3 complement receptors (MCA 275R) and the mouse monoclonal ED-1 raised against rat lysosomal membrane antigen of activated macrophage/microglia were obtained from AbD Serotec (Darmstadt, Germany). Rabbit polyclonal anti-PAR recognizing poly(ADP-ribose) polymers and anti-BDNF were purchased from Calbiochem (Meudon, France) and Chemicon (Molsheim, France), respectively. For secondary antibodies, the Alexa Fluor 488- and 568-conjugated anti-rabbit and –mouse antibodies were purchased from Molecular probes and the horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit and –mouse antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

Animal Model

The experiments were carried out on 132 male Wistar rats (290–310 g; Depré, Saint-Doulchard, France) and were conducted

according to the French Department of Agriculture guidelines (license no. 21CAE035). The animals were housed five per cage and kept under 12/12 h light/dark cycle and allowed *ad libitum* access to food and water. Anesthesia was induced by i.p. injection of chloral hydrate (400 mg/kg). Permanent focal ischemia was induced by photothrombotic cortical occlusion as previously described [39]. Briefly, anesthetized rats were infused for 20 s with the photosensitizer dye bengal (20 mg/kg, i.v.) and a laser beam was focused with an optic fiber (1 mm internal diameter, emerging power 90 mW) through the skull on the right hemisphere (1 mm posterior and 3 mm lateral relative to the bregma). The laser system is a diode-pumped solid-state laser (LCS-DLT-312, Opton Laser International, Orsay, France) working at 532 nm. The skull was irradiated for 5 min, the irradiation beginning 30 s before the dye injection.

Cortical Tissue Sampling

Anesthetized animals (400 mg/kg, chloral hydrate; i.p.) were transcardially perfused with saline and then, brains were removed. The cerebral cortices were quickly dissected and spread on glass slide at 0°C. Two concentric samples of cortical tissue (P1, P2) were punched with increasing internal diameter (4.6 and 9.5 mm) as indicated in figure 1A. The diameter of the different punches was chosen from the histological assessment of the ischemic lesion [40]. At 24 h post-ictus when the lesion reaches maximal size, P1 corresponded to infarcted tissue only. At other post-ictus times, P1 corresponded to a mixed of infarcted and non infarcted tissue

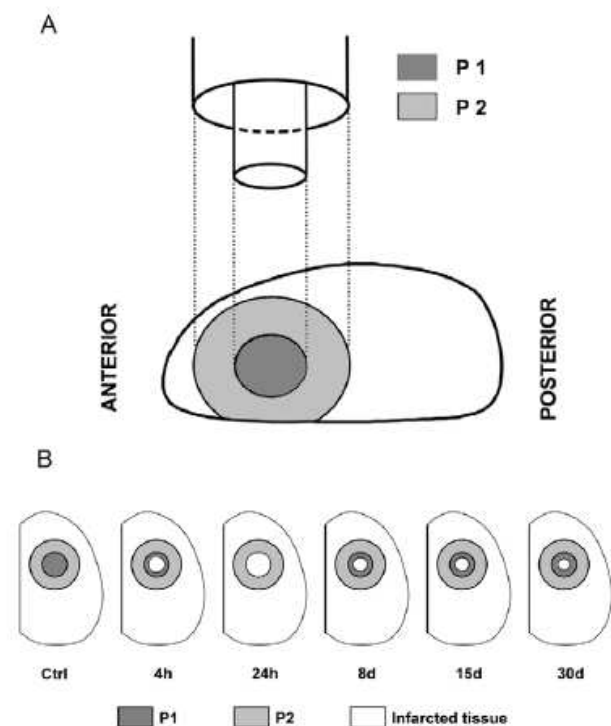


Figure 1. Cortical tissue sampling and dimensions of ischemic lesion. (A) Two concentric cortical samples (P1 and P2) were collected using punches with increasing internal diameters (4,6 and 9,5 mm, respectively). (B) At 24 h, P1 corresponded to lesioned tissue whereas P2 rim corresponded to unlesioned tissue whatever the time point considered. Infarcted area (Blank zone) evolves over the time after focal photothrombotic ischemia. Ctrl= control.
doi:10.1371/journal.pone.0008101.g001

while the surrounding rim P2 corresponded to unlesioned tissue whatever the time point considered as shown in figure 1B.

Immunoblot Analysis

After homogenization in seven volumes of lysis buffer [bi-distilled water containing 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 1% triton X-100, 1% protease inhibitor (Sigma P8340)], total protein extracts of the different punches were sonicated and centrifuged at 10,000 ×g for 10 min. An aliquot of the supernatant was kept for BCA protein measurement. Equal amounts of proteins were dissolved in Laemmli solution (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) with 2-mercaptoethanol 5% and were heated at 85°C for 10 min. Proteins were separated on 10–12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) according to [41]. Proteins were electrophoretically transferred onto PVDF membrane (0.2 μm pore size) in cold transfer buffer [10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃ (pH 9.9) and 20% methanol]. The membranes were incubated overnight at 4°C in 5% non-fat dry milk in TBS [20 mM Tris-HCl (pH 7.6) and 137 mM NaCl] containing 0.1% Tween 20 to block unspecific binding. Membranes were washed, incubated for 4 h at room temperature with specific primary antibodies at the following dilutions: anti-synaptophysin (1/2000), anti-GAP-43 (1/2000) and anti-β-actin (1/5000) and for 90 min with a horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG (1/80000). Protein-antibody complexes were visualized using the enhanced chemiluminescence Western blotting detection system according to the manufacturer's protocol (GE Healthcare, Orsay, France). The membranes were stripped and probed with an anti-β-actin antibody (Sigma A5441) used as internal control. Synaptophysin, GAP-43 and β-actin band densities were determined by scanning densitometry (Vilbert-Loumat, Marne la Vallée, France). A computer-based imaging system (Scion, NIH software, Bethesda, USA) was used to measure the relative optical density of each specific band. Data were expressed as arbitrary units.

Elisa

Cerebral levels of BDNF were determined with a commercial ELISA kit (Chemikine, Chemicon, Molsheim, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after dilution in the homogenization buffer (1/10, v/v, see above for its composition), 50 μl of cerebral samples obtained from P1 and P2 punches were incubated overnight in pre-coated microplates. They were then incubated with biotinylated anti-BDNF antibody followed by HRP-streptavidin. The oxidation of the enzyme substrate, the 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB), was measured at 450 nm using a plate reader (vector-3 1420 multilabe, Perkin Elmer, Waltham, USA). All assays were performed in triplicate. Cortical BDNF levels were expressed in pg/mg of proteins.

Histology

Animals were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) and the brains were washed by transcardiac perfusion with saline and further perfused with 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5). The removed brains were postfixed in the same fixative for 1 h and transferred for 48 h in a 20% sucrose solution in PBS. They were then frozen in isopentane at -45°C and stored at -80°C. Coronal sections (20-μm thick) were cut in a cryostat (HMSSO, Microm, Francheville, France) at -20°C.

Assessment of the Infarct Volume

Coronal sections (20-μm thick) were cut in a cryostat at 200 μm intervals, collected on slides, and stained with Cresyl violet (0.4%,

pH 3.5). Injured cortical areas, i.e. unstained tissue as a reflection of cell loss (Figure 2B), were measured using the computer image analysis system (Scion, NIH software, Bethesda, USA) and the distance between respective coronal sections were used to calculate a linear integration for the lesion volume determination as previously described [42].

Immunohistofluorescence

All brain sections from different animal groups were simultaneously run to ensure identical staining conditions. After rinsing in PBS (pH 7.4), the sections were incubated for 2 h in 10% goat serum (GS), 0.3% Tween-20 in PBS to block the non-specific binding sites and thereafter overnight at 4°C with the primary antibody in PBS containing 0.3% Tween-20 and 5% GS used at the following dilutions: anti-PAR (1/250), anti-OX-42 (1/150), anti-ED-1 (1/150), anti-BDNF (1/100). For BDNF detection, pre-treatment with proteinase K was used for antigen retrieval (10 μg/ml, 10 min). For cellular localization of PAR and BDNF expression in neurons and microglia, double immunohistofluorescence experiments have been performed by the simultaneous incubation of either the rabbit polyclonal antibodies recognizing

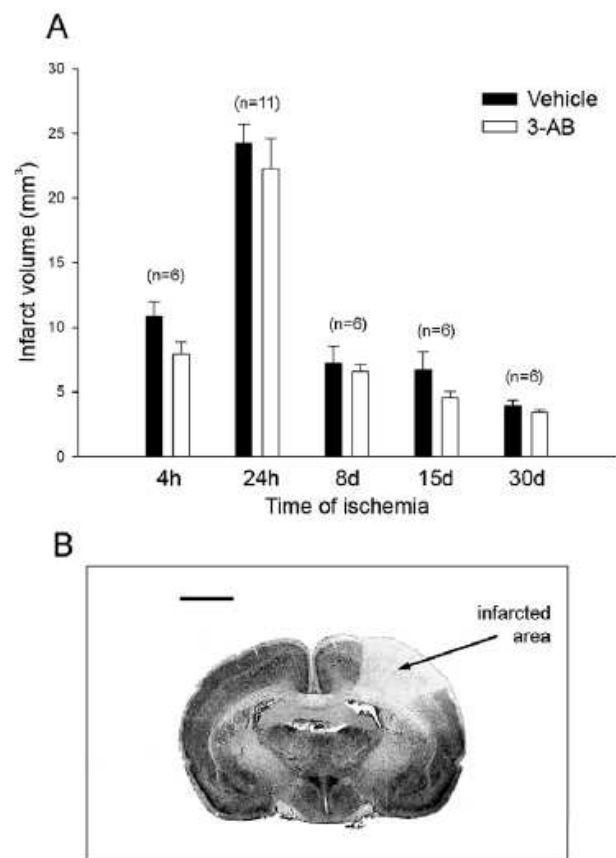


Figure 2. Temporal evolution of infarct volume: effect of 3-AB treatment. (A) Measurements of infarct volume (mm³) were performed at 4 h, 24 h, 8 d, 15 d and 30 d after the onset of ischemia. 3-AB (90 mg/kg) was given (i.p.) right after the induction of photothrombotic ischemia. Values are expressed as means ± S.E.M. n in bracket indicates the number of animals in each experimental condition. (B) Representative photograph of a brain section stained with Cresyl violet after 24 h of ischemia. The injured cortical area is unstained as the reflection of cell loss. Scale bar = 2.5 mm. doi:10.1371/journal.pone.0008101.g002

PAR or BDNF and the mouse monoclonal antibodies recognizing NeuN or OX-42 at 4°C overnight. After 4 washes, antibody visualization was achieved by the incubation for 3 h at room temperature with Alexa 488-conjugated anti-mouse and/or Alexa 568-conjugated anti-rabbit IgGs (1:1000). Negative controls were prepared by omitting the primary antibodies. The sections were then coverslipped with a fluorescent mounting medium and observed with an epifluorescent microscope (Eclipse E600, Nikon).

Treatment

The 3-aminobenzamide (3-AB) was dissolved in DMSO (1 mg/μl). The DMSO solution was then diluted (1/100) in NaCl 0.9%. The 3-AB (90 mg/kg) was administered by i.p. route just after the onset of ischemia. The effects of 3-AB treatment were measured at different time points between 4 h and 1 month post-ictus and compared with those of corresponding vehicle.

Quantification and Statistical Analysis

All assessments were performed by an observer blinded to the experimental conditions. The OX-42 immunoreactive cells were counted in the infarcted cortical area at 20× magnification using an epifluorescence microscope in 3 coronal sections at -1.60, -1.00, -0.40 mm from the bregma. Cells were counted continuously in 8 horizontal and 6 vertical fields passing by the center of the lesion using a 0.090 mm² square grid. The final results were expressed per mm².

All values were expressed as means ± S.E.M. of n rats (six to eleven animals in each group). Comparisons among groups of rats were made using non-parametric Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney for independent variables. Statistical significance was set at P<0.05.

Results

Infarct Volume and PARP-1 Activation

The infarct volume measurements were performed 4 h, 24 h, 8 d, 15 d and 30 d after the onset of ischemia. As shown in figure 2, photothrombotic ischemia leads in the early times (4 and 24 h) to an enlargement of the cortical lesion reaching a maximal value of 24,25 mm³ at 24 h. Consistent with previous data [40,42], this first phase corresponds to the maturation of the infarction whereas at longer time points (8, 15 and 30 d), the infarct volumes decrease time-dependently until 3,90 mm³ at 30 d, the last time point considered in our study.

In our experimental conditions, photothrombotic ischemia leads to PARP-1 activation at 4 h and 24 h after the onset of ischemia as evidenced by a marked PAR immunostaining, the enzymatic product of PARP-1 (Fig. 3A). The staining was found maximal at 4 h as compared to 24 h of ischemia and disappeared at longer time points (data not shown). Cellular localization of PAR formation was assessed in neurons and microglia by double immunostaining experiments (Fig. 3B and 3C, respectively). Colocalization for PAR and NeuN revealed that PAR formation in neurons was found maximal at 4 h of ischemia as compared to 24 h (Fig. 3B). Conversely, PAR formation in microglial cells appeared only after 24 h of ischemia (Fig. 3C). Indeed, no PAR/OX-42 double-labeled cells were observable at 4 h of ischemia.

Consistent with a rapid PARP-1 activation described after focal ischemia [43], the PARP-1 inhibition was performed by 3-AB i.p. injection right after the induction of photothrombotic ischemia. Treatment with 3-AB produced an important decrease in PAR immunostaining at 4 h and resulted in an almost disappearance of poly(ADP-ribose) at 24 h (Fig. 3A), which demonstrates a reduced capacity for PARP-1 activation in 3-AB treated animals and

validates our pharmacological treatment. Despite this effective inhibition, the 3-AB treatment (90 mg/kg, i.p.) did not produce any significant reduction in infarct volume and thus, whatever the kinetic points considered. Finally, to ascertain the absence of neuroprotection in 3-AB treated animals, the neuronal density was also assessed at 24 h. There was no variation between the two groups of animals (data not shown).

OX-42 and ED-1 Immunostaining

OX-42. Microglia/macrophages activation was assessed by OX-42 expression. As shown in figure 4, our data revealed that ischemia induces a robust microglia/macrophages activation observable as soon as 4 h, the earliest time point investigated in our study. At this time, OX-42 staining evidenced positive cells with a ramified morphology, homogeneously distributed in the lesion (Fig. 4A1–2). After 24 h of ischemia, the staining was located in the boundary of the lesion and indicated the presence of two distinct cellular morphologies, stellate-shaped and rounded amoeboid cells (Fig. 4C1–2). At longer time points (8, 15 and 30 d), OX-42-positive cells exposed an amoeboid cellular morphology only and populated the whole infarcted area (Fig. 4E, G, I). Since microglia and hematogenous macrophages can adopt both ramified and amoeboid appearance [6], these two cellular types are undistinguishable as far as no discriminating cellular markers are available. However, based on studies using toxic liposomes depleting hematogenous macrophages [5] or GFP transgenic bone marrow chimeric mice [6,7] we can assume that in our experimental conditions, early OX-42 and ED-1 staining observed in a very hypo-perfused area is attributable to local resident microglia while at longer time points (8, 15 and 30 d), these markers can be expressed by both types of cells.

In our experimental conditions, PARP-1 inhibition by 3-AB treatment was associated with a very important decrease in OX-42 staining at 4 h (Fig. 4B1–2) and 24 h (Fig. 4D1–2) of ischemia as compared to vehicle treated animals. Indeed, the number of OX-42 positive cells was significantly reduced by ~75% at 4 h and ~63% at 24 h of ischemia following 3-AB treatment (Table 1). These results showed that PARP-1 inhibition induces a robust decrease in resident microglial cells activation. On the other hand, no differences were observable after 8 d of ischemia between vehicle and 3-AB treated groups of animals (Fig. 4E, F, G, H, I, J and table 1).

ED-1. Because round amoeboid morphology can be associated with phagocytic capacity of activated local microglia and blood-born monocytes derived macrophages, the expression of lysosomal protein ED-1 was studied (Fig. 5). Our data show almost no ED-1 immunostaining in the early times of ischemia (4 h, 24 h; Fig. 5A1–2, C1–2), which is in agreement with the lack of phagocytic activity known during the ramified state in OX-42 positive cells. In the line with the few amoeboid cells observed after OX-42 staining in the vehicle treated group at 24 h, a few number of ED-1 positive cells were detected at this time of ischemia (Fig. 5C1–2). At longer time points, the pattern of ED-1 staining was similar to that observed with OX-42 marker with an intense staining within the infarcted zone. The similar distribution between these two markers reveals that most of the amoeboid cells have acquired phagocytic properties.

Treatment with 3-AB did not produce important differences in term of ED-1 expression. In the early times, we were able to detect the disappearance of the few ED-1 cells stained at 24 h (Fig. 5D1–2) whereas at longer time points, no marked differences were observable between vehicle and 3-AB treated groups of animals (Fig. 5E, F, G, H, I, J).

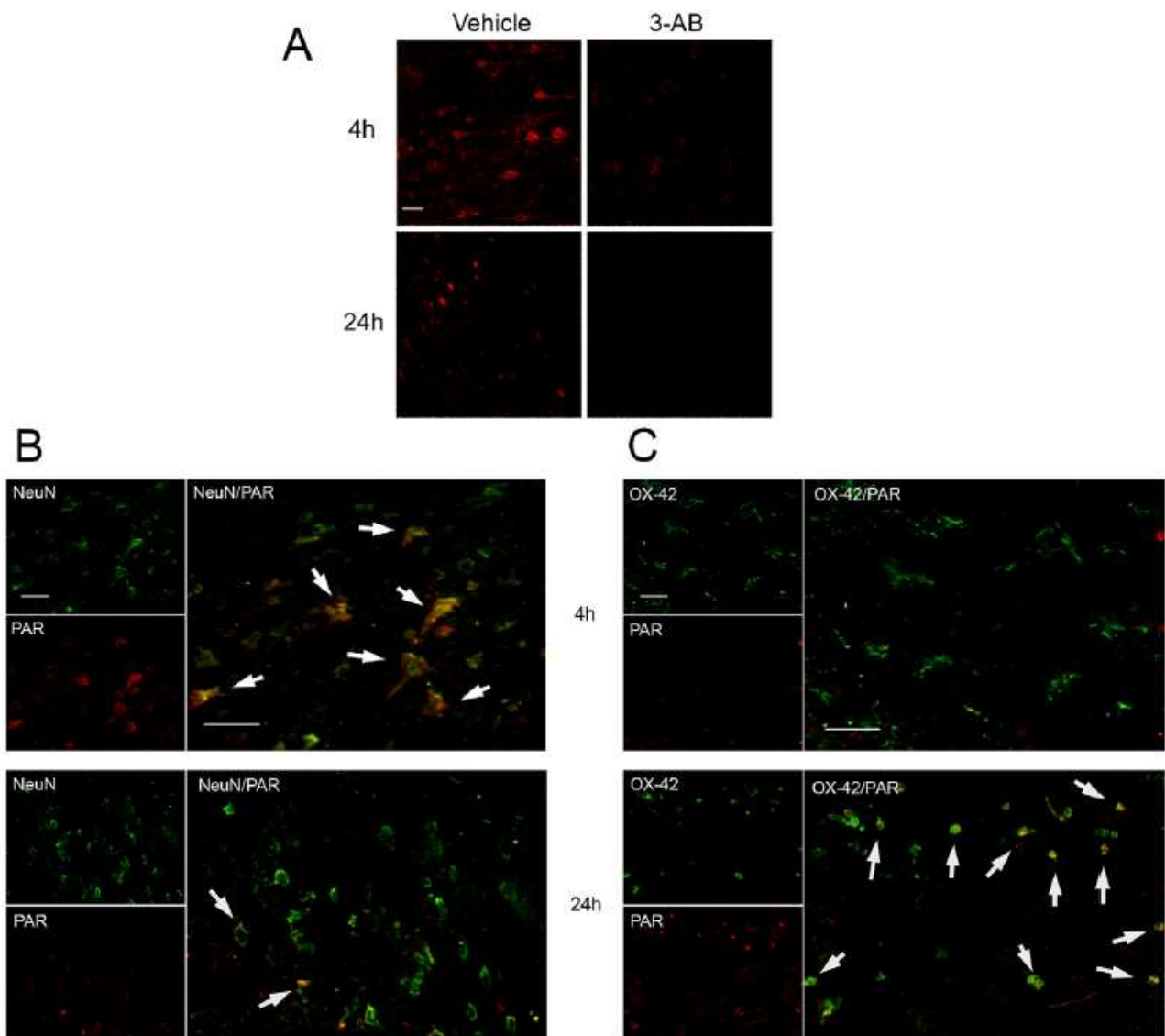


Figure 3. Effect of 3-AB treatment on PARP-1 activation and PAR/NeuN, PAR/OX-42 immunocolocalization. (A) PARP-1 activation, evidenced by PAR immunostaining, was performed on coronal sections of rats submitted to 4 h and 24 h of ischemia and treated with vehicle or with 3-AB. A marked decrease in PAR formation was observable after 3-AB treatment. (B) Immunocolocalization for PAR and NeuN was performed at 4 h and 24 h of ischemia. Arrows show double-positive cells. Ischemia-induced PAR formation in neurons is predominant at 4 h. (C) Immunocolocalization for PAR and OX-42 was performed at 4 h and 24 h of ischemia. Arrows show double-positive cells. Ischemia induces PAR formation in OX-42 positive cells at 24 h only. Photomicrographs are representative of 6 to 11 animals at each time point. Scale bars = 50 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0008101.g003

GAP-43 and Synaptophysin Expression

Since neuroplastic changes have been shown to be a delayed phenomenon [44], GAP-43 and synaptophysin expression were investigated by western blotting experiments in the two concentric samples of cortical tissue P1 and P2 at longer time points of ischemia (8, 15 and 30 d).

As shown in figure 6, photothrombotic ischemia led to a significant and sustained increase in post-ischemic GAP-43 expression at 8, 15 and 30 d in P1 (Fig. 6A) and at 15 and 30 d in P2 (Fig. 6B) as compared to control values.

After 3-AB treatment, our results indicated that the expression of GAP-43 was significantly reduced in both P1 and P2 punches as compared to vehicle treated group of

animals. The expression of GAP-43 was found significantly repressed in P1 at 30 d (-41%, Fig. 6A) and in P2 at 8 d only (-23%, Fig. 6B).

Concerning synaptophysin expression, our results also showed that photothrombosis led to a significant increase in this protein expression in P1 at 15 and 30 d (Fig. 7A) and in P2 at 30 d (Fig. 7B) as compared to control values.

In 3-AB treated animals, the increase in synaptophysin expression was abrogated in both P1 and P2 cortical samples. The expression was found significantly lower in P1 at 15 and 30 d (-21% and -39%, respectively, Fig. 7A) and in P2 at 30 d (-44%, Fig. 7B) as compared to vehicle treated animals.

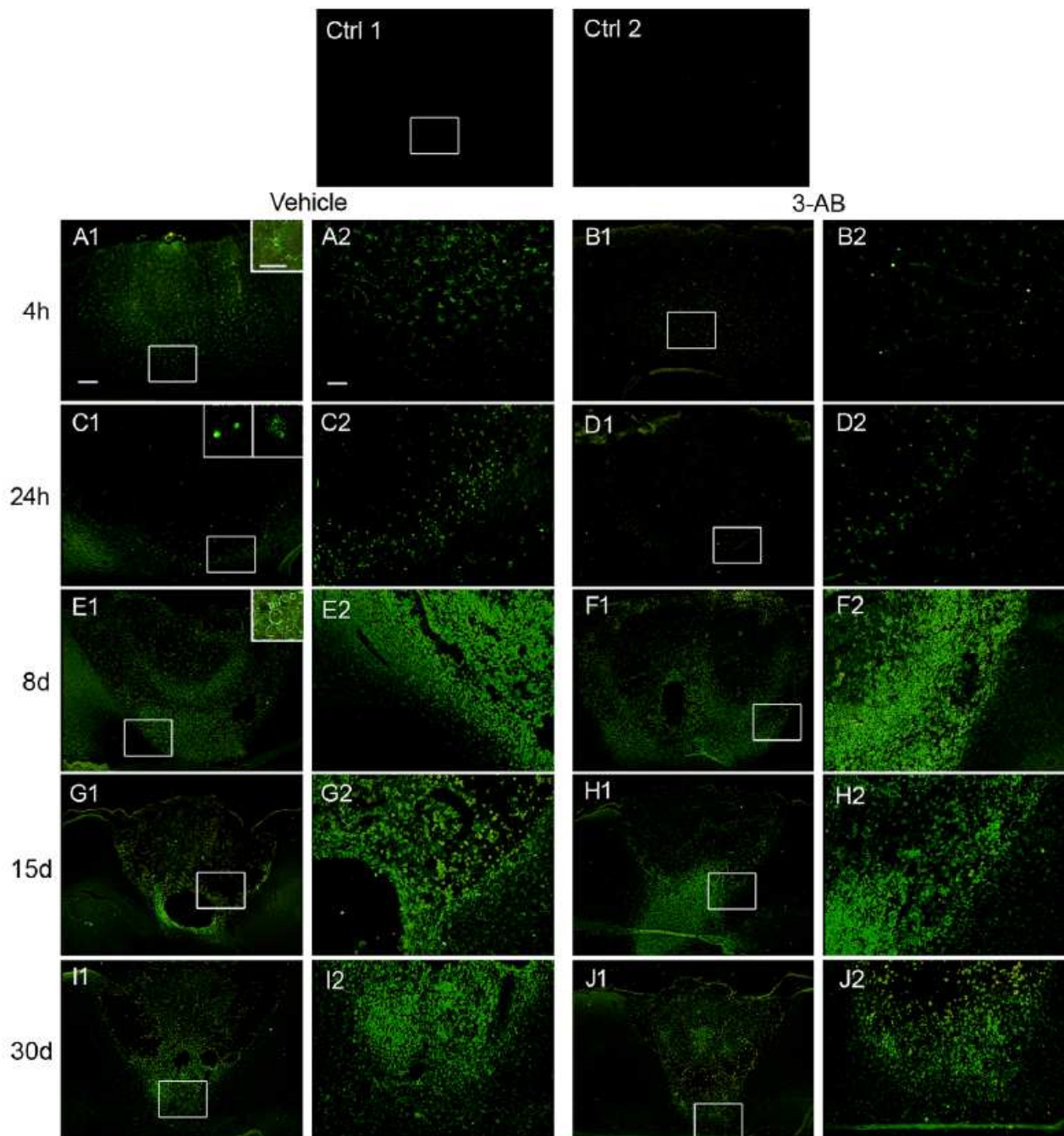


Figure 4. Time course of microglial/macrophages activation after ischemia: effect of 3-AB treatment. Microglial/macrophages activation was assessed at 4 h, 24 h, 8 d, 15 d and 30 d of photothrombotic ischemia by immunostaining using anti-OX-42 antibody, recognizing type 3 complement receptors. Rats treated with 3-AB showed an important decrease in microglial/macrophages activation in the acute phase of ischemia (B1–2 and D1–2). At longer time points, no differences were observed between vehicle (E, G, I) and 3-AB treated animals (F, H, J). Photomicrographs are representative of 6 to 11 animals at each time point. Scale bar=200 μ m in panels 1, 40 μ m in panels 2 and 50 μ m (insert).
doi:10.1371/journal.pone.0008101.g004

BDNF Expression

ELISA. The ELISA assessment of tissue BDNF level was performed in each cortical punch (P1/P2, Fig. 8A). Our data revealed that photothrombotic ischemia induces an early increase in BDNF production in these two samples. As compared to control levels (160 and 167 pg/mg in P1 and P2, respectively), post-

ischemic BDNF production increased significantly by 71% and 53% at 4 h and by 296% and 176% at 24 h. After 8 days of ischemia, the cortical level of BDNF returned to control values.

Following 3-AB treatment, the increase in BDNF levels was significantly attenuated in the lesioned area P1 only, after both 4 and 24 h of ischemia. The reduction was modest at 4 h (12%)

Table 1. Number of OX-42 positive cells.

| Time of ischemia | 4 h | 24 h | 8 d | 15 d | 30 d |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Vehicle | 208±20 | 113±16 | 945±32 | 460±53 | 320±36 |
| 3-AB | 54±12* | 42±8* | 938±45 | 539±39 | 262±42 |

Number of OX-42 positive cells after 4 h, 24 h, 8 d, 15 d and 30 d of ischemia in the infarcted area. Data represented the number of OX-42 positive cells per mm² and are expressed as means±S.E.M. from 6 to 11 animals.

*P<0.05 vs vehicle treated animals.

doi:10.1371/journal.pone.0008101.t001

whereas it reached 32% after 24 h of ischemia as compared to vehicle treated animals.

BDNF and OX-42 immunocolocalization. To further evaluate the role of microglia in BDNF production, immunohistochemistry for OX-42 and BDNF expression was performed after 24 h of ischemia. As shown in figure 8B, colocalization experiments indicated that OX-42-positive cells located in the lesioned tissue, expressed BDNF. Nevertheless, the double immunostaining revealed that the colocalization was only partial since only a third of OX-42-positive cells produced BDNF.

As already mentioned, 3-AB treatment greatly reduced OX-42 immunostaining. Accordingly, BDNF-positive microglial cells were hardly identified as compared to vehicle treated animals.

BDNF and NeuN immunocolocalization. Neuronal expression of BDNF was assessed by immunohistochemistry for NeuN and BDNF after 24 h of ischemia. As shown in figure 8C, colocalization experiments indicated that most of the remaining neurons in the lesioned tissue expressed BDNF. Following 3-AB treatment, a similar pattern of expression was found as compared to vehicle treated animals (Fig. 8C).

Discussion

Our study reveals that the decrease in acute microglial activation was associated with a long term down regulation of synaptophysin and GAP-43 expression and to a significant decrease in BDNF production. Taken together, our data argue in favour of an important role for microglia in brain neuroplasticity stimulation possibly through BDNF production.

In order to investigate the role of microglial cells in the stimulation of neuroplastic changes, PARP-1 inhibition was used as a means of down-regulating the microglial response induced by ischemia. PARP-1 is a nuclear enzyme that normally functions to facilitate DNA repair. It is also well established that extensive PARP-1 activation promotes cell death through processes involving energy depletion and the release of apoptosis-inducing factor [45–47]. In our study, the choice of a strategy targeting PARP-1 activation was based on previous studies showing that PARP-1 is also an essential component in the regulation of inflammatory response through its function as a coactivator of NF-κB [37,48,49]. Our data show that photothrombotic focal ischemia was associated with an early PARP-1 activation occurring within the first 24 h with a maximal intensity observed at 4 h after the onset of ischemia which is consistent with previous reports [50]. Double immunostaining for PAR and NeuN or OX-42 revealed that PAR formation in neurons was an early process as compared to that observed in microglial cells. Indeed, PAR formation in neurons was visible with a maximal intensity after 4 h whereas it appeared only after 24 h of ischemia in microglial cells. Our results are in agreement with previous data showing a rapid PARP-1 activation in neurons after a focal brain ischemia [43] and

are also consistent with previous reports showing an activation of PARP-1 in microglial cells [19,37]. Interestingly, despite the effective PARP-1 inhibition evidenced by a strong decrease in PAR staining, no significant differences in term of temporal evolution of lesion size between vehicle and 3-AB treated animals were observed. Noteworthy, the relative high dose of 3-AB (90 mg/kg, i.p.) was purposely used in our experimental conditions in order to target the inflammatory response only. Such a choice was initially based on study showing that 3-AB is no more neuroprotective beyond 80 mg/kg (i.p.) following MCAO in mice [51]. Indeed, since the inflammatory reaction intensity is closely related to the extent of the lesion, the investigation of the role of microglial cells activation would have been inappropriate if a marked decrease in the inflammatory reaction was found to be associated with a strong and significant neuroprotection. The lack of protective effects observed in studies using high doses of 3-AB and its derivatives is not fully understood. It has been suggested that benzamide could produce non-specific effects counteracting with glucose metabolism, nucleic acid and protein synthesis [36]. However, since similar U-shaped dose-response curve has been observed with structurally distinct PARP inhibitors such as 3,4-dihydro 5-[4-(1-piperidinyl) butoxy]-1(2H)-isoquinolinone (DPQ) in response to cerebral ischemia [52], it can be hypothesized that high doses of PARP-1 inhibitors could impair DNA repair in the peri-infarcted area that otherwise would have been rescued. Finally, a robust and important decrease of OX-42 and ED-1 staining was observed in 3-AB treated animals in the early phase of ischemia, confirming that PARP-1 inhibition is an efficient approach for the modulation of local resident microglial activation and proliferation.

One of the most striking finding of this work is that the repression of microglial activation and proliferation in the acute stage of ischemia is associated with a significant decrease in the long term expression of neuronal plasticity proteins in the vicinity of the lesioned area. Indeed, the expression of GAP-43, an intracellular growth protein playing a role in sprouting, neuronal pathfinding and branching [53] and the expression of synaptophysin, an integral membrane protein of synaptic vesicles, widely used as an immunohistological marker for the determination of synaptogenesis [54] were both significantly reduced in 3-AB treated animals as compared to vehicle treated animals. Concerning GAP-43 expression, 3-AB treatment induces a reduced expression already significant at 8 d and at one month post-ischemia whereas statistical differences were found for synaptophysin expression at longer time points (15 and 30 d of ischemia) between the two groups of animals. Thus, our results suggest that limiting the early microglial activation is associated with a decrease in neurite outgrowth and synaptogenesis that normally occurred after brain injuries [44,55–57]. This raises the possibility that microglial cells play an important role in the reorganization of the tissue surrounding the lesioned area.

Among the neurosupportive compounds synthesized by microglia, experimental evidences point out to BDNF as an appealing candidate. In the past decade, BDNF has been involved in learning, memory and neuroplasticity [58,59]. In addition, exogenous treatment with BDNF or exposing animals to enriched housing or exercise regimens, which also increases BDNF, enhances behavioral recovery after brain injury [33,60,61]. Moreover, blocking BDNF through antisense or immunoadhesin chimera (TrkB-IgG) strategies negates exercise-induced cognitive improvement after focal ischemia [62] or traumatic brain injury [63]. As assessed by ELISA, our study showed that photothrombotic ischemia is associated with a significant and robust increase in BDNF production within the infarct zone at 4 h and 24 h of

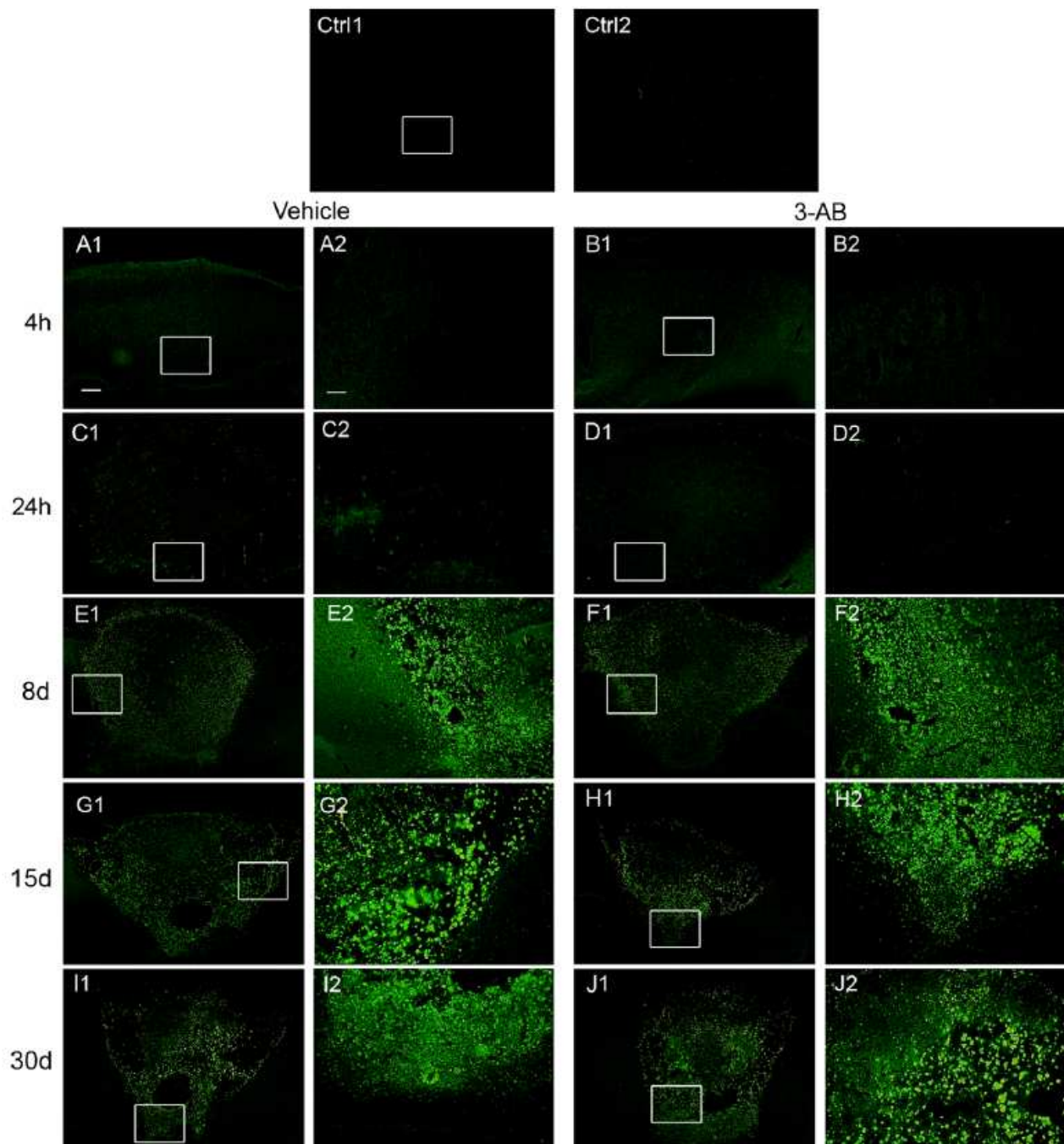


Figure 5. Time course of microglial/macrophages phagocytic activity after ischemia: effect of 3-AB treatment. Immunostaining for phagocytic activity (microglia/macrophages) was performed using anti-ED1 antibody at 4 h, 24 h, 8 d, 15 d and 30 d of photothrombotic ischemia. Note the absence of staining at 4 h in vehicle (A1–2) and 3-AB treated animals (B1–2). Rats treated with 3-AB (D1–2) showed a decrease in ED-1 staining at 24 h as compared to vehicle treated animals (C1–2). At longer time points, no differences were observed between vehicle (E, G, I) and 3-AB treated animals (F, H, J). Photomicrographs are representative of 6 to 11 animals at each time point. Scale bar = 200 μ m in panels 1 and 40 μ m in panels 2.
doi:10.1371/journal.pone.0008101.g005

ischemia. This result is consistent with an early increase in BDNF levels in the hemisphere ipsilateral to a focal photothrombotic lesion in rats [64]. In addition, our immunohistological experiments specify for the first time after a focal ischemia, that

approximately a third of microglial cells express BDNF after 24 h of photothrombotic ischemia. Concerning this partial BDNF expression, it can be hypothesized that among microglial cells populating the brain lesion, coexist several subpopulations with

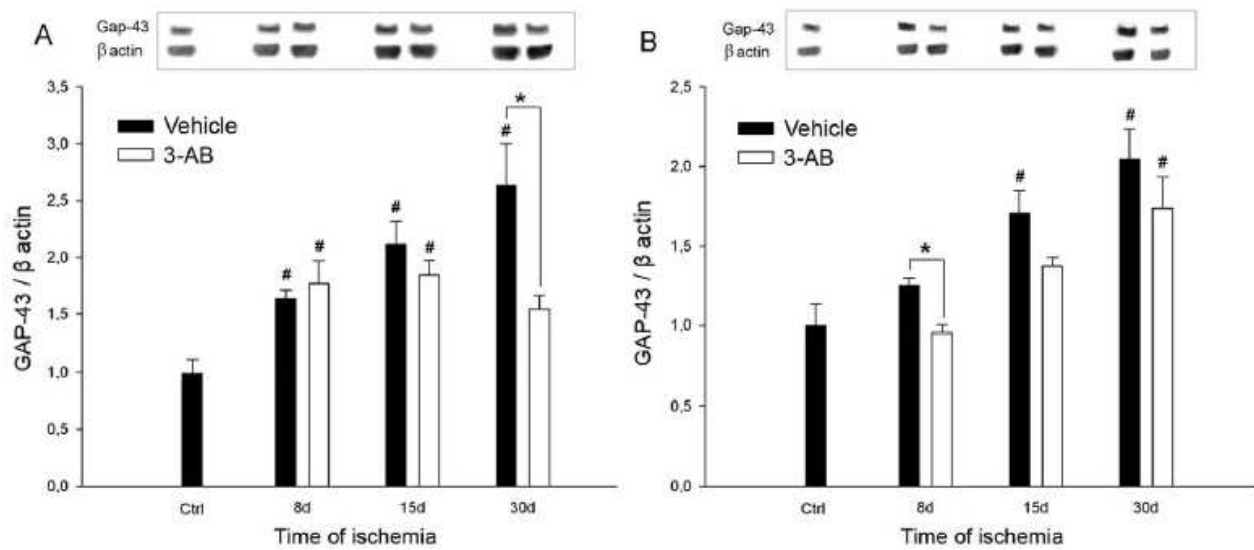


Figure 6. Time course of GAP-43 expression after ischemia: effect of 3-AB treatment. Western blots were prepared after 8 d, 15 d and 30 d of ischemia from P1 (A) and P2 (B) samples. Representative immunoblots are shown and densitometric analysis was performed after normalization of GAP-43 expression on β -actin levels. Photothrombotic ischemia induces an increase in GAP-43 expression from 8 d of ischemia in P1 and 15 d in P2. 3-AB treatment repressed GAP-43 expression in P1 at 30 d. In P2, the overall GAP-43 expression was lower in 3-AB treated animals but a significant decrease was found at 8 d only. Values are expressed as means \pm S.E.M. and are representative of 5 to 6 animals. ($\#$ $P < 0.05$ vs ctrl (sham operated animals); $*$ $P < 0.05$ vs vehicle treated animals). doi:10.1371/journal.pone.0008101.g006

opposite phenotypes. This hypothesis is conceivable regarding the highly complex (ambivalent) microglial response in damage formation, inflammation and repair after stroke. Following 3-AB treatment, BDNF levels are significantly decreased by 30% and microglial cells expressing BDNF hardly identified as compared to vehicle treated animals. This only $\sim 30\%$ decrease in BDNF levels

as compared to the two-third decrease in microglial cells number in 3-AB treated animals can be explained by the fact that BDNF remains expressed by neurons. Consistently, our immunohistological experiments reveal that both groups of animals exhibit a similar BDNF staining in neurons. Such a neuronal expression of BDNF is in agreement with previous studies reporting that brain

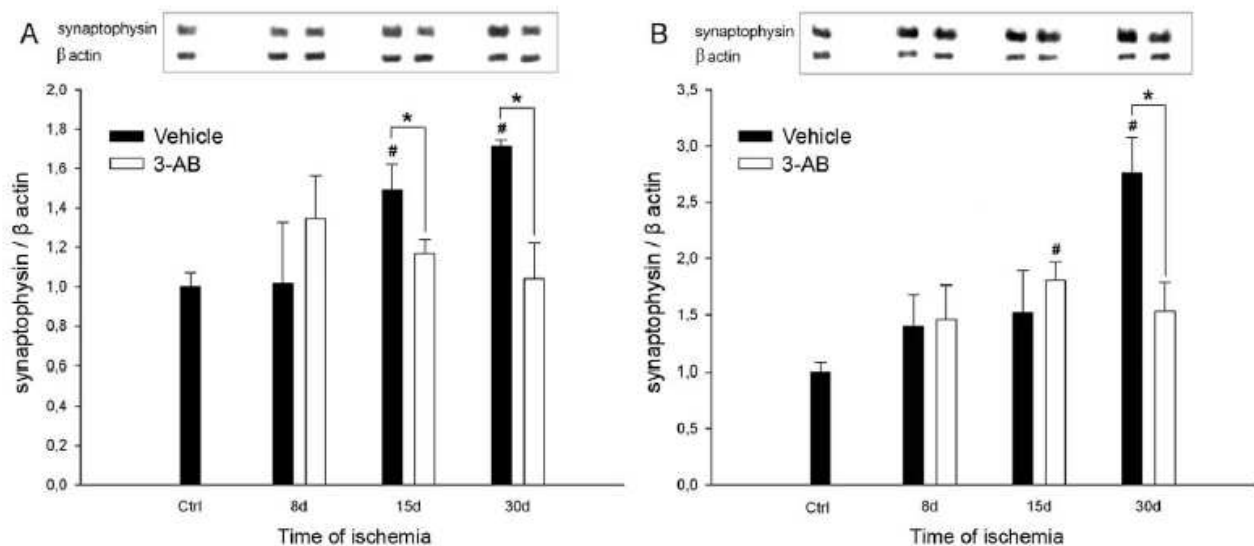


Figure 7. Time course of synaptophysin expression after ischemia: effect of 3-AB treatment. Western blots were prepared after 8 d, 15 d and 30 d of ischemia from P1 (A) and P2 (B) samples. Representative immunoblots are shown and densitometric analysis was performed after normalization of synaptophysin expression on β -actin levels. Photothrombotic ischemia induces an increase in synaptophysin expression in P1 after 15 d and 30 d of ischemia and in P2 after 30 d. 3-AB treatment abrogates synaptophysin induction in P1 after 15 d and 30 d of ischemia and in P2 after 30 d. Values are expressed as means \pm S.E.M. and are representative of 5 to 6 animals. ($\#$ $P < 0.05$ vs ctrl (sham operated animals); $*$ $P < 0.05$ vs vehicle treated animals). doi:10.1371/journal.pone.0008101.g007

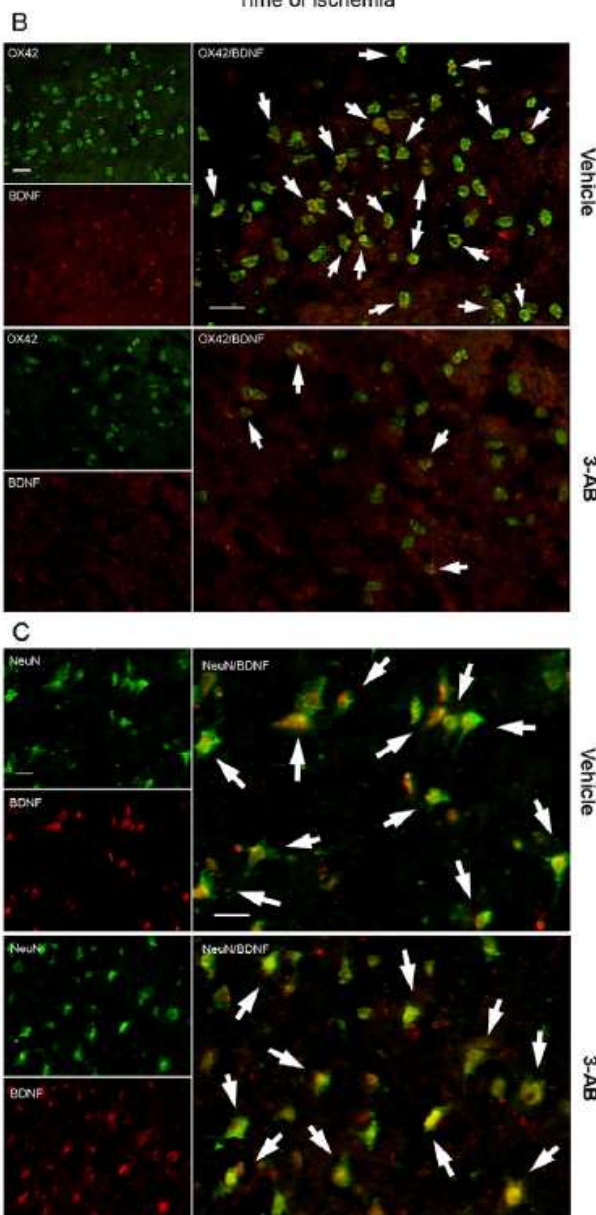
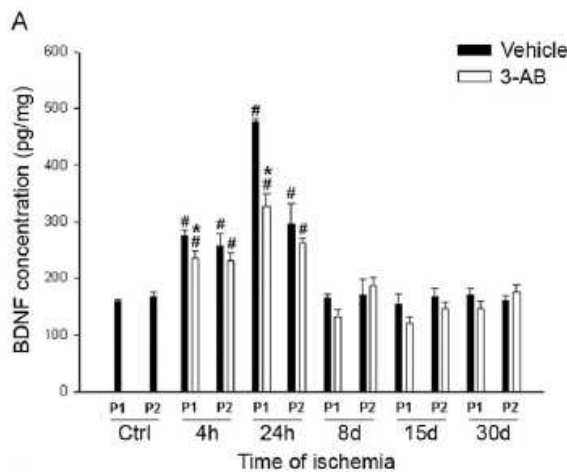


Figure 8. Time course of BDNF production after ischemia and BDNF/OX-42 immunocolocalization: effect of 3-AB treatment.

(A) Elisa measurements of BDNF production in P1 and P2 samples were performed at 4 h, 24 h, 8 d, 15 d and 30 d of ischemia. Photothrombosis induces a significant increase in BDNF production in both P1 and P2 at 4 h and 24 h of ischemia. Note that the production was found maximal in P1 at 24 h. Rats treated with 3-AB showed a significant reduction in BDNF production in P1 at 4 h and 24 h of ischemia. Values are expressed as means±S.E.M. and are representative of 5 to 6 animals, ([#] P<0.05 vs ctrl (sham operated animals); *P<0.05 vs vehicle treated animals). (B) Immunocolocalization for OX-42 and BDNF was performed at 24 h of ischemia. Arrows show double-positive cells. Ischemia induces expression of BDNF in some OX-42 - positive cells. Rats treated with 3-AB showed an almost complete disappearance of double positive cells. (C) Immunocolocalization for NeuN and BDNF was performed at 24 h of ischemia. Arrows show double-positive cells. Ischemia induces expression of BDNF in neurons. Rats treated with 3-AB exhibited a similar co-immunostaining. Photomicrographs are representative of 6 to 11 animals. Scale bars=50 μm. doi:10.1371/journal.pone.0008101.g008

ischemia results in an early induction of this trophic factor as evidenced by upregulation of BDNF mRNA or protein levels in neurons within and around the lesion [64–66].

Although not investigated directly here, BDNF production may be coupled to GAP-43 and synaptophysin inductions in several ways. Indeed, in a model of cervical axotomy, BDNF injection has been reported to stimulate GAP-43 expression and consequently axogenesis and repair [67]. Moreover, a very recent study performed on cortical culture using GAP-43 knockout animals directly shows that GAP-43 is necessary to the neurotrophic effects of BDNF [68]. In this study, GAP-43 was identified as a common mediator of the plastic regeneration effect of BDNF. At the synaptic level, BDNF has been shown to be important for synaptogenesis and to synaptic ultra structural composition in developing and adult brain [35,69]. In addition, treatment using statin that induces BDNF up-regulation is linked to an increase in synaptophysin expression and to a significant improvement in functional recovery [55]. Consistently, blocking BDNF action abrogates exercise-induced synaptophysin expression [70]. Likewise, BDNF knockout mice have a reduced level of synaptophysin in hippocampal synaptosomes [71]. Finally, even though our study and others suggest that BDNF is a preponderant compound in mediating post-ischemic neuronal plasticity processes, it is important to underline that other molecules besides BDNF such as IGF-1 [22,24], GDNF [72,73], thrombospondins [74] or erythropoietin [75,76], which are also produced by microglial cells, have been reported to promote post-stroke plasticity events. Thus, it is likely that neuroplasticity processes are orchestrated by several compounds, BDNF being one of these pro-neuroplastic factors.

In conclusion, the present findings imply a supportive role for microglial cells in the induction of neuroplastic changes after ischemia through the production of BDNF. Although important progress has been made in the comprehension of microglial cells function, the identification of the mechanisms that determine microglia accomplishing destructive or constructive role in the CNS is a prerequisite in elaborating future strategies that would maintain and sustain the trophic support provided by microglial cells. A targeted protection of neurosupportive microglial cells could represent a novel and exciting approach to potentiate post-stroke neuroregenerative responses.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AM NB AB CM PG. Performed the experiments: AM NB CM APT PG. Analyzed the data: AM NB CM APT AB CM PG. Wrote the paper: NB CM PG.

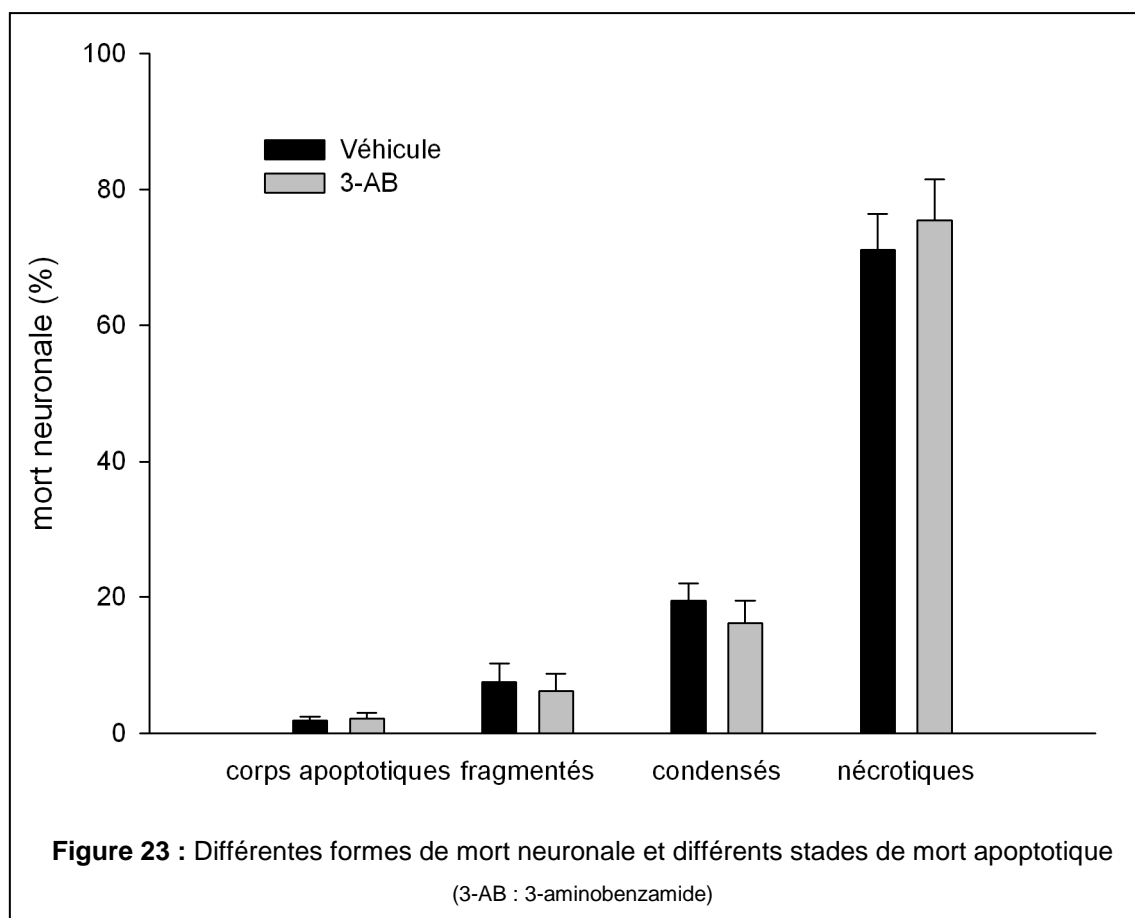
References

1. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22: 391–397.
2. Kempermann G, Neumann H (2003) Neuroscience. Microglia: the enemy within? *Science* 302: 1689–1690.
3. Brea D, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castillo J (2009) Inflammatory and neuroimmunomodulatory changes in acute cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis* 27 Suppl 1: 48–64.
4. Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312–318.
5. Schroeter M, Jander S, Huitinga I, Witte OW, Stoll G (1997) Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. *Stroke* 28: 382–386.
6. Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, et al. (2003) Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 183: 25–33.
7. Schilling M, Besselmann M, Muller M, Strecker JK, Ringelstein EB, et al. (2005) Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 196: 290–297.
8. Feuerstein GZ, Wang X (2001) Inflammation and stroke: benefits without harm? *Arch Neurol* 58: 672–674.
9. Marchetti B, Abbracchio MP (2005) To be or not to be (inflamed)—is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci* 26: 517–525.
10. Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2009) Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 158: 1021–1029.
11. Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 40: 140–155.
12. Zheng Z, Yenari MA (2004) Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuro Res* 26: 884–892.
13. Chong ZZ, Li F, Maiese K (2005) Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. *Prog Neurobiol* 75: 207–246.
14. Tuttolomondo A (2008) Cytokines and inflammation markers in ischemic stroke. *Curr Pharm Des* 14: 3547–3548.
15. Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8: 57–69.
16. Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, et al. (1999) A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13496–13500.
17. Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J (2001) Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci* 21: 2580–2588.
18. Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13632–13637.
19. Kauppinen TM, Suh SW, Berman AE, Hamby AM, Swanson RA (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase suppresses inflammation and promotes recovery after ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 29: 820–829.
20. Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, Ulrich O, Reymann KG, et al. (2006) Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J* 20: 714–716.
21. Imai F, Suzuki H, Oda J, Ninomiya T, Ono K, et al. (2007) Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 488–500.
22. Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J (2007) Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 27: 2596–2605.
23. Kim BJ, Kim MJ, Park JM, Lee SH, Kim YJ, et al. (2009) Reduced neurogenesis after suppressed inflammation by minocycline in transient cerebral ischemia in rat. *J Neurol Sci* 279: 70–75.
24. Thored P, Heldmann U, Gomes-Leal W, Gisler R, Darsalia V, et al. (2009) Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia* 57: 835–849.
25. Nakajima K, Yamamoto S, Kohsaka S, Kurihara T (2008) Neuronal stimulation leading to upregulation of glutamate transporter-1 (GLT-1) in rat microglia in vitro. *Neurosci Lett* 436: 331–334.
26. Stoll G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58: 233–247.
27. Neumann J, Sauerzweig S, Ronicke R, Gunzer F, Dinkel K, et al. (2008) Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *J Neurosci* 28: 5965–5975.
28. Batchelor PE, Liberatore GT, Wong JY, Porritt MJ, Fritschs F, et al. (1999) Activated macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 19: 1708–1716.
29. Lai AY, Todd KG (2008) Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia* 56: 259–270.
30. Nagamoto-Combs K, McNeal DW, Morecraft RJ, Combs CK (2007) Prolonged microgliosis in the rhesus monkey central nervous system after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 24: 1719–1742.
31. Schabitz WR, Schwab S, Spranger M, Hacke W (1997) Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 500–506.
32. Wu D (2005) Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *NeuroRx* 2: 120–128.
33. Schabitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, et al. (2007) Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 38: 2165–2172.
34. Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 55: 233–238.
35. Mattson MP (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1144: 97–112.
36. Szabo C, Dawson VL (1998) Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 19: 287–298.
37. Chiarugi A, Moskowitz MA (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 85: 306–317.
38. Kauppinen TM, Swanson RA (2007) The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. *Neuroscience* 145: 1267–1272.
39. Van Hoecke M, Prigent-Tessier AS, Garnier PE, Bertrand NM, Filomenko R, et al. (2007) Evidence of HIF-1 functional binding activity to caspase-3 promoter after photothrombotic cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci* 34: 40–47.
40. Van Hoecke M, Prigent-Tessier A, Bertrand N, Prevotat L, Marie C, et al. (2005) Apoptotic cell death progression after photothrombotic focal cerebral ischaemia: effects of the lipophilic iron chelator 2,2'-dipyridyl. *Eur J Neurosci* 22: 1045–1056.
41. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
42. Demougeot C, Van Hoecke M, Bertrand N, Prigent-Tessier A, Mosiat C, et al. (2004) Cytoprotective efficacy and mechanisms of the liposoluble iron chelator 2,2'-dipyridyl in the rat photothrombotic ischemic stroke model. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 1080–1087.
43. Tokime T, Nozaki K, Sugino T, Kikuchi H, Hashimoto N, et al. (1998) Enhanced poly(ADP-ribosylation) after focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 991–997.
44. Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE (1995) Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke* 26: 2135–2144.
45. Ha HC, Snyder SH (1999) Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13978–13982.
46. Ying W, Chen Y, Alano CC, Swanson RA (2002) Tricarboxylic acid cycle substrates prevent PARP-mediated death of neurons and astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 774–779.
47. Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, et al. (2002) Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297: 259–263.
48. Oliver FJ, Menissier-de Murcia J, Nacci C, Decker P, Andriantsitohaina R, et al. (1999) Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Embo J* 18: 4446–4454.
49. Moroni F (2008) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) and postischemic brain damage. *Curr Opin Pharmacol* 8: 96–103.
50. Takahashi K, Greenberg JH (1999) The effect of reperfusion on neuroprotection using an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase. *Neuroreport* 10: 2017–2022.
51. Couturier JY, Ding-Zhou L, Croci N, Plotkine M, Margall I (2003) 3-Aminobenzamide reduces brain infarction and neutrophil infiltration after transient focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol* 184: 973–980.
52. Takahashi K, Pieper AA, Croul SE, Zhang J, Snyder SH, et al. (1999) Post-treatment with an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates cerebral damage in focal ischemia. *Brain Res* 829: 46–54.
53. Benowitz LJ, Routtenberg A (1997) GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. *Trends Neurosci* 20: 84–91.
54. Valorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F (2004) Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 26: 445–453.
55. Chen J, Zhang C, Jiang H, Li Y, Zhang L, et al. (2005) Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 281–290.
56. Carmichael ST (2006) Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. *Ann Neurol* 59: 735–742.
57. Millot-Serruot E, Chausset A, Mosiat C, Prigent-Tessier A, Bertrand N, et al. (2007) Effect of early decrease in the lesion size on late brain tissue loss, synaptophysin expression and functionality after a focal brain lesion in rats. *Neurochem Int* 50: 328–335.
58. Binder DK, Scharfman HE (2004) Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22: 123–131.

59. Lipsky RH, Marini AM (2007) Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Ann N Y Acad Sci* 1122: 130–143.
60. Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2003) Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience* 122: 647–657.
61. Kim MW, Bang MS, Han TR, Ko YJ, Yoon BW, et al. (2005) Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Res* 1052: 16–21.
62. Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Dore JJ, et al. (2009) Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke* 40: 1490–1495.
63. Griesbach GS, Hovda DA, Gomez-Pinilla F (2009) Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain-injury in rats is dependent on BDNF Activation. *Brain Res*.
64. Sulejczak D, Ziemińska E, Czarkowska-Bauch J, Nosecka E, Strzalkowski R, et al. (2007) Focal photothrombotic lesion of the rat motor cortex increases BDNF levels in motor-sensory cortical areas not accompanied by recovery of forelimb motor skills. *J Neurotrauma* 24: 1362–1377.
65. Kokaia Z, Zhao Q, Kokaia M, Elmer E, Metsis M, et al. (1995) Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp Neurol* 136: 73–88.
66. Rickhag M, Teilmann M, Wieloch T (2007) Rapid and long-term induction of effector immediate early genes (BDNF, Neurtin and Arc) in peri-infarct cortex and dentate gyrus after ischemic injury in rat brain. *Brain Res* 1151: 203–210.
67. Kobayashi NR, Fan DP, Giehl KM, Bedard AM, Wiegand SJ, et al. (1997) BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and α -tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *J Neurosci* 17: 9583–9595.
68. Gupta SK, Mishra R, Kusum S, Spedding M, Meiri KF, et al. (2009) GAP-43 is essential for the neurotrophic effects of BDNF and positive AMPA receptor modulator S18986. *Cell Death Differ* 16: 624–637.
69. Waterhouse EG, Xu B (2009) New insights into the Role of Brain-derived Neurotrophic Factor in Synaptic Plasticity. *Mol Cell Neurosci*.
70. Vaynman SS, Ying Z, Yin D, Gomez-Pinilla F (2006) Exercise differentially regulates synaptic proteins associated to the function of BDNF. *Brain Res* 1070: 124–130.
71. Pozzo-Miller LD, Gorschalk W, Zhang L, McDermott K, Du J, et al. (1999) Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J Neurosci* 19: 4972–4983.
72. Kobayashi T, Ahlenius H, Thored P, Kobayashi R, Kokaia Z, et al. (2006) Intracerebral infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor promotes striatal neurogenesis after stroke in adult rats. *Stroke* 37: 2361–2367.
73. Batchelor PE, Wills TE, Hewa AP, Porritt MJ, Howells DW (2008) Stimulation of axonal sprouting by trophic factors immobilized within the wound core. *Brain Res* 1209: 49–56.
74. Chamak B, Dobbertin A, Mallat M (1995) Immunohistochemical detection of thrombospondin in microglia in the developing rat brain. *Neuroscience* 69: 177–187.
75. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, et al. (1999) A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 643–651.
76. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M (2004) Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 35: 1732–1737.

C Résultats complémentaires

L'objectif du travail étant d'étudier l'impact d'une inhibition de la RI microgliale sur les mécanismes de neuroplasticité induits par une ischémie, il était crucial que le traitement au 3-AB n'influence pas la taille de la lésion. En effet, dans le cas contraire une variation de la taille de la lésion aurait mécaniquement entraîné une variation de la RI et de la neuroplasticité associée à l'ischémie. C'est pour cela que le 3-AB a été utilisé à la concentration de 90 mg/kg. En effet, Couturier *et al.* (2003) ont montré que le 3-AB présentait une courbe d'efficacité en cloche et que l'effet neuroprotecteur du 3-AB disparaissait au delà de 80 mg/kg. Afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans la perte de l'effet neuroprotecteur du 3-AB, nous avons cherché à caractériser la mort cellulaire au niveau de la lésion à l'aide d'une double coloration au bleu de Toluidine et à la fuchsine acide qui permet de différencier les neurones en fonction de leur type de mort cellulaire : nécrotique ou apoptotique (noyau condensé, fragmenté ou corps apoptotique).



Suite à l'ischémie cérébrale, environ 80 % des neurones sont morts selon un processus nécrotique et 20 % sont engagés dans un processus apoptotique (Figure 23). On peut supposer

qu'avec un traitement au 3-AB, la diminution de l'activité de PARP-1 s'accompagne d'un ralentissement de la baisse des stocks énergétiques, ce qui favorise la survie cellulaire. Cependant, si l'inhibition de PARP-1 est trop forte, il y a un risque que le trop grand ralentissement de la réparation des dommages à l'ADN ne devienne délétère pour la cellule. Les neurones ne mourraient donc pas par déficit énergétique mais entreraient alors dans un processus apoptotique déclenché en réponse aux dommages subit par l'ADN. Il y aurait alors perte de la neuroprotection avec passage d'une mort nécrotique vers une mort apoptotique. Toutefois, nos résultats ne semblent aller dans le sens de cette hypothèse. En effet, si le traitement au 3-AB à 90 mg/kg s'accompagne effectivement d'aucune modification significative du volume de la lésion, il n'entraîne pas non plus de variation dans la nature de la mort neuronale (Figure 23). Les mécanismes expliquant la forme en cloche de la courbe d'efficacité du 3-AB d'un point de vue neuroprotecteur reste donc encore à clarifier.

II Seconde étude : Etude de l'expression du BDNF total, du BDNF mature et du pro-BDNF dans l'hémisphère ipsilatéral et contralatéral accompagnant une ischémie.

Référence : Madinier A, Bertrand N, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Marie C & Garnier P (2011) Contralateral vs ipsilateral hemispheres : Post-ischemic total, pro- and mature BDNF expression(s). Article en préparation

A Résumé

1) Objectif de l'étude

Notre objectif a été de caractériser l'expression du pro-BDNF et du BDNF mature en réponse à une ischémie cérébrale. Dans ce but, des rats ont été soumis à une ischémie focale permanente d'origine photothrombotique. Le tissu lésé, le cortex péri-lésionnel et l'hippocampe du coté ipsilatéral ainsi que les zones équivalentes du coté contralatéral à la lésion ont été prélevés à différents temps post-ischémique (4 h, 24 h, 8 j et 30 j).

L'évolution du taux de BDNF total a été évaluée par dosage ELISA. Les cinétiques d'expression du BDNF mature et du pro-BDNF ont été déterminées par Western blotting. Finalement, l'origine cellulaire du BDNF a également été étudiée par des colocalisations en immunohistofluorescence.

2) Principaux résultats

Nos résultats révèlent un certain nombre de divergences entre le dosage ELISA et le Western blot. Cependant, d'une manière générale, une augmentation du pro-BDNF et du BDNF mature ou du BDNF mature seul est observée aux temps précoces (4 h) au niveau et autour de la lésion ainsi que dans le cortex contralatéral. Cette augmentation aurait pour but d'initier la neuroplasticité post-ischémique. Au niveau cortical, on observe une augmentation du pro-BDNF seul à 24 h au sein de la lésion. Cette augmentation serait vraisemblablement associée à la mort des neurones. Au niveau de l'hippocampe, on observe une augmentation du BDNF mature ou du pro-BDNF au temps long (8 j et 30 j) aussi bien du coté ipsilatéral que contralatéral. Une fois encore, cette expression est vraisemblablement liée à l'induction de mécanismes neuroplastiques. Finalement nos résultats révèlent que les neurones ne

constituent pas la source exclusive de BDNF en réponse à l'ischémie, mais que les cellules microgliales et les astrocytes participent également à sa synthèse.

L'ensemble de ces données suggèrent une participation du BDNF dans la réponse à l'ischémie, mais soulignent également l'importance du choix de la technique utilisée afin d'obtenir des résultats fiables.

B Publication

Time course of total, pro- and mature BDNF in contralateral versus ipsilateral cortex and hippocampus in response to photothrombotic cortical stroke.

Alexandre Madinier^{1,2}, Nathalie Bertrand^{1,2,3}, Claude Mossiat^{1,2}, Anne Prigent-Tessier^{1,2}, Christine Marie^{1,2}, Philippe Garnier^{1,2,3}.

1: Unité INSERM U887 Motricité-Plasticité, Dijon F-21078 France

2: Université de Bourgogne, Dijon F-21079 France

3: Département Génie Biologique, IUT, Dijon F-21078 France

Correspondence to:

Dr. Philippe Garnier

Laboratoire INSERM U887 Motricité-Plasticité, Faculté de Pharmacie

7 Boulevard Jeanne d'Arc, BP 87900

21079 Dijon, France

Phone: +33 (0)3 80 39 34 94

Fax: +33 (0)3 80 39 32 27

E-Mail: pgarnier@u-bourgogne.fr

ABSTRACT

The brain derived neurotrophic factor (BDNF) exerts pleiotropic effects during neuronal development and in the adulthood. Beside, after brain insults BDNF has been shown to induce neuroprotection and to play a central role in adaptive brain plasticity. However, like the other members of the neurotrophin family, BDNF is produced as a pro-form that can be processed to mature BDNF form which both mediate ambivalent actions. Indeed, while pro-BDNF through p75^{NTR} activation has been shown to induce apoptosis, mature BDNF interaction with trkB predominantly supports neuronal survival and induces neuroplastic events. In this context, the objective of our study was to investigate the proper effect of cerebral ischemia on the long term (up to one month) expression of total, pro- and mature BDNF and to assess the contribution of neuronal and non neuronal cells in stroke-induced BDNF expression. Experiments were conducted in rats subjected to cortical photothrombotic ischemia. Total BDNF expression was assessed by ELISA while discrimination of both pro- and mature BDNF expression was studied by Western blotting in cortical and hippocampal areas of both hemispheres. Our results show that total, pro- and mature BDNF expressions are augmented in the early times (4-24h) of ischemia within the lesioned, the surrounding non lesioned and the contralateral cortical areas. At longer time points, total BDNF was still increased at 8d in regions distant from the lesion (hippocampi and contralateral cortex) while pro- and mature forms rise between 8d to 30d in hippocampic territories only. In term of cellular distribution, BDNF immunoreactivity was found in neurons but also in non neuronal cells ipsilaterally whereas in the opposite side BDNF staining was restricted to neurons. Our data while raising the question of the pertinence of total BDNF expression in a context of studying its supportive potential action indicate that such assessment has to be coupled with the discrimination of both forms. In addition, our data confirm the important role of BDNF in post-stroke adaptive mechanisms and argue in favour of an important contribution of the hippocampal territory and of the contralateral hemisphere in BDNF related post-stroke neuronal circuit remodelling suggesting that strategies targeting this hemisphere are likely to mediate functional compensation.

INTRODUCTION

Among the neurotrophin family, the brain derived neurotrophic factor (BDNF), originally discovered in 1982 (Barbe *et al.*, 1982) is one of the growth factor that has emerged as a major candidate of interest. Indeed, beside its implication in survival and differentiation functions during the development of mammalian nervous system, BDNF exerts potent effects during the adulthood. Thus, it has been reported to be involved in neuronal survival and maintenance, neurogenesis, modulating dendritic branching and dendritic spine morphology (Horch *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2008) and in activity-dependent synaptic modifications that enable neuronal network to develop suitable connections required for learning and memory formation (Horch *et al.*, 1999; McAllister *et al.*, 1995; Patterson *et al.*, 1996). In addition, after brain insults, BDNF has been shown to induce neuroprotection (Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2001) and to be a crucial signalling molecule for adaptive brain plasticity. Interventions that increase functional recovery following cerebral ischemia are frequently linked to an upregulation of BDNF levels (Chen *et al.*, 2005a; Kim *et al.*, 2005; Vaynman *et al.*, 2004) whereas lowering its production or blocking its effect after stroke attenuates neuroplastic changes and functional recovery induced either spontaneously or by rehabilitation (Chen *et al.*, 2005b; Madinier *et al.*, 2009; Ploughman *et al.*, 2009).

BDNF, like the other members of the neurotrophin family is produced as a pro-isoform that can be processed intra- or extra-cellularly to "mature" BDNF form. Indeed, pro-BDNF can be cleaved within the endoplasmic reticulum by furin or in regulated secretory vesicles by protein convertase 1 whereas, in the extracellular milieu, this cleavage is achieved by plasmin and some metalloproteinases (review in Lu *et al.*, 2005). Although "mature" BDNF has been considered for a long time as the unique biologically active form, more recently, several studies have suggested that pro-BDNF can also act as a ligand (Lee *et al.*, 2001; Teng *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2005). Indeed, while "mature" BDNF binds with greatest affinity to tropomyosin-related kinase B (trkB) receptor, it has been reported that pro-BDNF binds with a higher affinity to pan-neurotrophin receptor p75^{NTR} (Lee *et al.*, 2001, Squinto *et al.*, 1991). These different receptor affinities are important since it has been shown that interaction of mature BDNF with trkB receptor predominantly supports neuronal survival (for review Huang & Reichardt, 2003) and mediates long term potentiation (LTP) at synapses (for review Pang & Lu, 2004) while

p75^{NTR} activation results in pro-apoptotic signalling (Lee *et al.*, 2001) and elicits at the synaptic level long term depression (LTD) (Rösch *et al.*, 2005). Albeit the relevance and even the existence of a pro-BDNF with biological actions are still matter of vigorous debates (Barker, 2009), it seems that there are two forms of extracellular BDNF that may activate distinct receptors to mediate divergent neuronal actions.

Despite the central role of BDNF in both neuroprotection and recovery after stroke, available studies investigating BDNF expression after cerebral ischemia mainly focused on mRNA expression (Cormelli *et al.*, 1992; Hsu *et al.*, 1993; Rickhag *et al.*, 2007) or total protein expression in brain regions collected either at the lesion site or around the lesion following stroke (Madinier *et al.*, 2009; Sulejczak *et al.*, 2007). In addition, even though there are a few studies that have made distinction between the two BDNF forms (Alboni *et al.*, 2011; Tognoli *et al.*, 2010), these works have been performed in condition of stress-induced alterations of brain function (Tognoli *et al.*, 2010) or of physiological aging in rodents (Obiang *et al.*, 2011). Beside, to the best of our knowledge, studies investigating the proper effect of cerebral ischemia on both BDNF forms expressed are lacking. Regarding the divergent effects mediated by the two forms of BDNF on neuronal outcome, the objective of our study was therefore to investigate the long term expression (up to one month) of both pro- and mature forms of BDNF in rats subjected to photothrombotic cortical stroke. This assessment, realized by Western blotting using a new commercially available monoclonal rabbit antibody was performed in the infarcted cortical area, the surrounding non infarcted area and the hippocampi of both lesioned and non lesioned hemispheres. The discrimination of the two BDNF forms expressed after permanent focal ischemia was coupled to total BDNF measurement assessed by ELISA. In parallel, the contribution of neuronal and non neuronal cells in stroke-induced BDNF expression was also achieved.

MATERIALS AND METHODS

1. Reagents

Acrylamide and bis-acrylamide, sodium dodecylsulfate (SDS) and tween-20 were obtained from Bio-Rad (Ivry sur Seine, France). The polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes were purchased from GE Healthcare (Orsay, France). All other reagents were purchased from Sigma-Aldrich except where otherwise noted. The rabbit polyclonal antibody raised against BDNF (AB1779SP) and the mouse monoclonal antibody recognizing NeuN (MAB377) were

purchased from Chemicon (Millipore, Molsheim, France). The mouse monoclonal anti-CD11b (OX-42) that recognizes type 3 complement receptors of activated macrophage/microglia (MCA 275R) and the mouse monoclonal antibody raised against GFAP (G3893) for astrocytes characterization were obtained respectively from AbD Serotec (Darmstadt, Germany) and Sigma (Saint Quentin-Fallavier, France), respectively. Finally, the rabbit monoclonal antibody raised against BDNF (clone EPR 1292, ref 3160-1) was purchased from Epitomics. For secondary antibodies, the Alexa Fluor 488- and 568-conjugated anti-rabbit and -mouse antibodies were purchased from Molecular probes and the horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit and -mouse antibodies were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

2. Ischemic stroke model

The experiments were carried out on 56 male Wistar rats (290–310 g; Dépré, Saint-Doulchard, France) and were conducted according to the French Department of Agriculture guidelines (license no. 21CAE035). The animals were housed five per cage and kept under 12/12h light/dark cycle and allowed *ad libitum* access to food and water.

Rats were subjected to a permanent focal ischemia induced by photothrombotic cortical occlusion as previously described [ref]. Briefly, anesthesia was induced by i.p. injection of chloral hydrate (400 mg/kg). Then, anesthetized rats were infused for 20s with the photosensitizer dye rose bengal (20 mg/kg, i.v.) and a laser beam was focused with an optic fiber (1 mm internal diameter, emerging power 90 mW) through the skull on the right hemisphere (1 mm posterior and 3 mm lateral relative to the bregma). The laser system is a diode-pumped solid-state laser (LCS-DLT-312, Opton Laser International, Orsay, France) working at 532 nm. The skull was irradiated for 5 min, the irradiation beginning 30 s before the dye injection. The animals were euthanized 4h, 24h, 8d and 30d following ischemia.

3. Experimental groups

The first set of animal groups was designed for the assessment of the post-ischemic total BDNF levels by ELISA as well as the pro- and mature BDNF expressions by Western blotting in the different cortical and hippocampal samples (see §4).

The second set of animal groups was performed to realize the cellular localization of BDNF by a double immunohistofluorescence on frozen fixed coronal brain sections (see §5).

All the measurements were made on 4h-, 24h-, 8d- and 30d-ischemic rats and on non-ischemic rats.

4. Cortical and hippocampal tissue sampling and preparation of protein extracts

Anesthetized animals (400 mg/kg; chloral hydrate; i.p.) were transcardially perfused with saline to flush out blood from cerebral vasculature and then brains were removed. The ipsi- and contralateral cortices and hippocampi were quickly dissected. The hippocampi were immediately weighted and frozen while the cortices were spread on glass slide at 0°C for further sampling. Two concentric samples of ipsilateral cortical tissue (P1, P2) were punched with increasing internal diameter (4.6 and 9.5 mm) as previously described (Madinier *et al.*, 2009). On the basis of the previous histological study of the ischemic lesion (Van Hoecke *et al.*, 2005), its maximal size is reached at 24 h post-ictus and therefore, P1 corresponded at this time to infarcted tissue only. At other post-ictus times, P1 corresponded to a mixed of infarcted and non infarcted tissue while the surrounding rim P2 corresponded to unlesioned tissue whatever the time point considered. In the contralateral cortex, homotopic cortical samples were realized by using the larger punch so that the contralateral cortical samples correspond to a pooled P1+P2 tissue sample. All the cerebral samples were stored at -80°C until further use.

To assess the total BDNF levels by ELISA and the expression of the different isoforms of BDNF by Western blotting, the different cerebral samples were first homogenized in seven volumes of lysis buffer [bi-distilled water containing 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10% glycerol, 1% triton X-100, 1% protease inhibitor (Sigma P8340)]. Then, the total protein extracts were sonicated and centrifuged at 10,000×g for 20 min. An aliquot of the supernatant was kept for BCA protein measurement and the remaining protein extracts were stored at -80°C.

5. Immunoblot analysis

Equal amounts of proteins were dissolved in Laemmli solution (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) with 2-mercaptoethanol 5% and were heated at 85°C for 10 min. Proteins were separated on 16% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) according to (1970). Proteins were electrophoretically transferred onto PVDF membrane (0.2 µm pore size) in cold transfer buffer [10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃ (pH 9.9) and 20% methanol]. The membranes were incubated for 1h at room temperature in 5% non-fat dry milk in TBS [20 mM Tris-HCl (pH 7.6)

and 137 mM NaCl] containing 0.1% Tween 20 to block unspecific binding. They were then washed, incubated overnight at 4°C with the primary rabbit monoclonal anti-BDNF antibody (1/2000) that detects precursor (proBDNF, 32kDa), truncated (28kDa) and mature (matBDNF, 14kDa) isoforms of BDNF. The membranes were washed with TBS-0.1% Tween 20 and then incubated for 90 min with the secondary antibody (horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG (1/80000). Protein-antibody complexes were visualized using the enhanced chemiluminescence Western blotting detection system according to the manufacturer's protocol (GE Healthcare, Orsay, France). The membranes were stripped and probed with an anti- β -actin antibody (1/5000; Sigma A5441) used as internal control. Pro-BDNF, mature BDNF and β -actin band densities were determined by scanning densitometry (Vilbert-Lourmat, Marne la Vallée, France). A computer-based imaging system (Scion, NIH software, Bethesda, USA) was used to measure the relative optical density (expressed as arbitrary units) of each specific band. Data were expressed as percentage of increase as compared to control values.

6. Total BDNF levels measurement

Total cortical and hippocampal levels of BDNF were determined with a commercial sandwich ELISA kit (Chemikine, Chemicon, Molsheim, France) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after dilution in the homogenization buffer (1/10, v/v, see above for its composition), 50 μ l of each cerebral sample were incubated overnight in pre-coated microplates. They were then incubated with biotinylated anti-BDNF antibody followed by HRP-streptavidin. The oxidation of the enzyme substrate in the presence of the chromogen 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) was measured at 450 nm using a plate reader (Vector-3 1420 Multilabe, Perkin Elmer, Waltham, USA). All assays were performed in triplicate. Total BDNF levels (pg/mg of proteins) were expressed as percentage of increase as compared to control values.

7. Immunohistofluorescence

The second set of animals were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) and the brains were washed by transcardiac perfusion with saline and further perfused with 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5). The removed brains were postfixed in the same fixative for 1h and transferred for 48h in a 20% sucrose solution in PBS. They were then frozen in isopentane at -45°C and stored at -80°C. Multiple sections

(20- μ m thick, starting +2 mm to bregma and extending back to -3 mm to bregma) were cut in a cryostat (HMSSO, Microm, Francheville, France) at -20°C, collected on SuperFrost Plus slides, and stored at -80°C.

All brain sections from different animal groups were simultaneously run to ensure identical staining conditions. After rinsing in PBS (pH 7.4), the sections were treated 10 min with proteinase K (10 μ g/ml) at room temperature (RT) for antigen retrieval and incubated for 2h in PBS containing 10% goat serum (GS) and 0.3% Tween 20 in order to block the non-specific binding sites. Thereafter, the sections were incubated for 3d at 4°C in the same medium containing the rabbit polyclonal antibody recognizing BDNF (1:100) in the presence of monoclonal antibodies recognizing either OX-42 (1:100), GFAP (1:500) or NeuN (1:500) in order to locate BDNF expression in microglia/macrophages, astrocytes and neurons, respectively. After three washes for 10 min in PBS, antibody visualization was achieved by the incubation for 3h (RT) with Alexa 488-conjugated anti-mouse and/or Alexa 568-conjugated anti-rabbit IgGs (1:1500). Negative controls were prepared by omitting the primary antibodies. The sections were then coverslipped with a fluorescent mounting medium and observed with an epifluorescent microscope (Eclipse E600, Nikon). BDNF expression in the different cerebral cells was graded on a following scale: (0) no expression; (+) mild expression; (++) moderate expression; (+++) high expression by two persons blinded to the experimental conditions.

8. Statistical analysis

All values were expressed as means \pm S.E.M. of n rats (5-7 animals in each group). Comparisons among groups of rats were made using non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney for independent variables. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

1. - Effect of photothrombotic ischemia on BDNF expression

BDNF expression measurements were performed 4h, 24h, 8d and 30d after the onset of ischemia in the lesioned (P1), the surrounding non lesioned cortical (P2) areas and in the hippocampus in the ipsilateral hemisphere. In the contralateral hemisphere, BDNF analysis was realized at the same times in the homotopic cortical area and in the hippocampus (Fig. 1 and 2). In these different brain regions, total BDNF expression performed by ELISA was coupled to

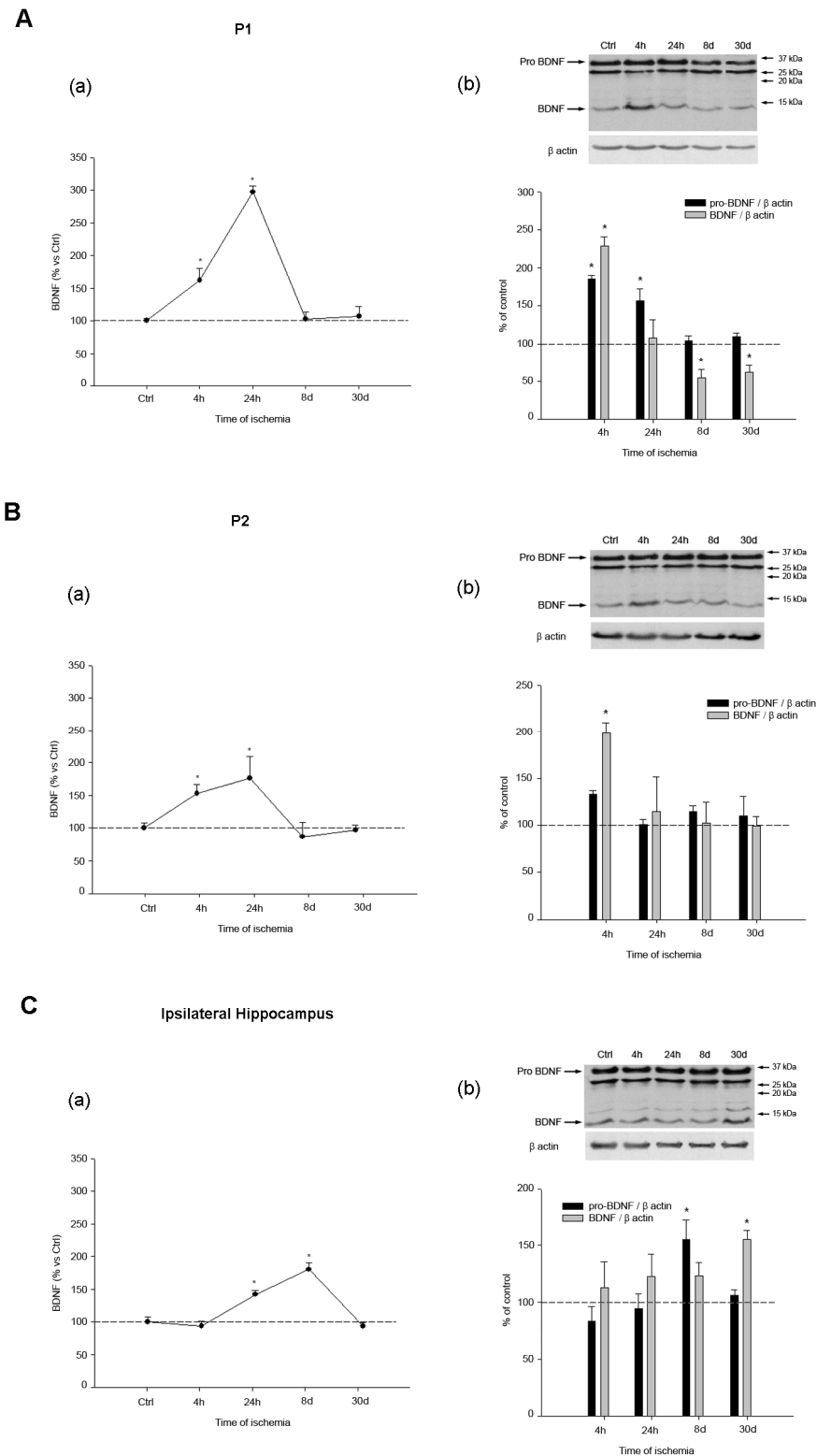


Figure 1 : Time course of BDNF production in response to photothrombotic cortical ischemia in different ipsilateral cerebral areas : lesioned cortex P1 (A), perilesioned cortex P2 (B) and hippocampus (C). For each area, the total BDNF was assessed by ELISA (a) and expression of both pro- and mature BDNF was analysed by Western blotting (b). Representative immunoblots are shown and densitometric analysis was performed after normalisation on β -actin levels. The analysis was performed 4h, 24h, 8d and 30d after ischemia. Values are expressed as mean \pm S.E.M. and are representative of 5 to 7 animals (* $P < 0.05$ vs ctrl (sham operated animals)).

the analysis of both pro- and mature BDNF expression as assessed by Western blotting.

1.1.-Ipsilateral hemisphere (Fig 1)

Lesioned cortical area (P1)

In the lesioned cortical area, Elisa assessment of total BDNF expression showed that photothrombotic ischemia induces a rapid and robust increase in total BDNF production (Fig. 1A_a). As compared to control levels, post-ischemic total BDNF production increased significantly by 61% at 4h and by 197% at 24h. After 8 days of ischemia, the level of total BDNF in this brain region returned to control values.

Regarding both pro- and mature BDNF forms, our data revealed that photothrombotic ischemia induces an increase in the two forms in the early times of ischemia (4-24h) as compared to the control values (Fig. 1A_b). Indeed, pro-BDNF was increased by 85% at 4h and by 57%

at 24h post-ictus whereas mature BDNF was significantly augmented by 128% at 4h only. At longer time points, both pro- and mature BDNF expressions were no longer significantly increased as compared to the control values. In the contrary, mature BDNF showed a significant decrease at 8d and 30d in this lesioned tissue (Fig. 1A_b).

Surrounding non lesioned cortical area (P2)

In the surrounding non lesioned cortical area, our data revealed that ischemia induces a rise in total BDNF production as compared to the control values (Fig. 1B_a). Although less important, the pattern of total BDNF expression revealed similar variations to those observed in the lesioned cortical area with a significant increase at 4h and 24h post-ictus (53% and 76%, respectively).

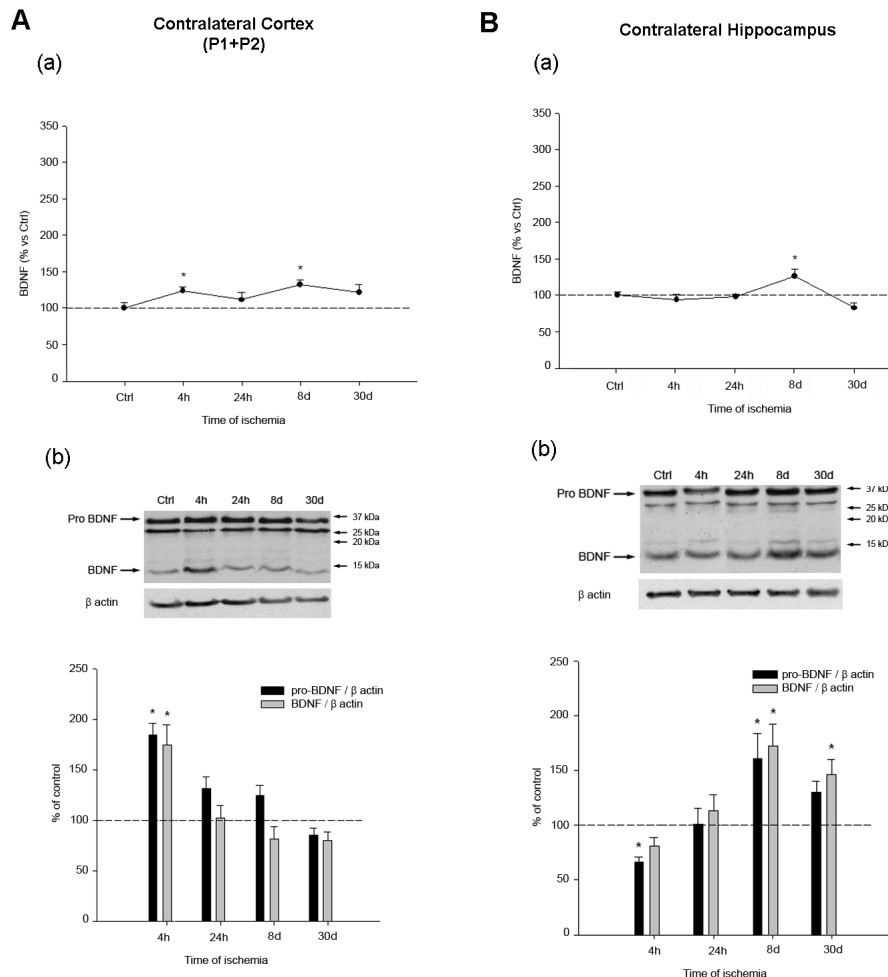


Figure 2 : Time course of BDNF production in response to photothrombotic cortical ischemia in different contralateral cerebral areas : P1+P2 homotopic cortical areas (A) and hippocampus (B). For each area, the total BDNF was assessed by ELISA (a) and expression of both pro- and mature BDNF was analysed by Western blotting (b). Representative immunoblots are shown and densitometric analysis was performed after normalisation on β-actin levels. The analysis was performed 4h, 24h, 8d and 30d after ischemia. Values are expressed as mean ± S.E.M. and are representative of 5 to 7 animals (*P<0.05 vs ctrl (sham operated animals)).

As shown in the figure 1B_b, the analysis of both pro- and mature BDNF expression indicated that in the surrounding non lesioned area, ischemia induces a significant and early increase in mature BDNF expression at 4h post-ictus (97%). Concerning the pro-BDNF form, no variations were observed and thus, whatever the time point considered.

Hippocampal area

As shown in figure 1C_a, total BDNF expression analysis revealed that photothrombotic ischemia led to an increase in BDNF production at 24h and 8d post-ictus (42% and 79%, respectively) in the hippocampus as compared to the control values.

Concerning the pro- and mature BDNF expressions, our results showed a significant rise in pro-BDNF expression at 8d (55%) whereas the mature form was found augmented at 30d (56%) as compared to control values.

Cortical area (P1+P2)

The Elisa assessment of total cortical BDNF levels revealed that cerebral ischemia is associated with a slight and steady increase in BDNF expression which reaches significance only at 4h (24%) and 8d (32%) post-ictus (Fig. 2A_a).

As shown in figure 2A_b, the expressions of both pro- and mature BDNF were increased only at 4h by 84% and 75%, respectively.

Hippocampal area

In the contralateral hippocampus, total BDNF expression was significantly enhanced only at 8d post- ischemia (27%) as compared to control values (Fig. 2B_a). Concerning pro- and mature BDNF expression, our data indicated that both forms were significantly increased at 8d (61% and 72%, respectively) whereas at 30d, only the mature BDNF exhibited a significant increased expression (46%) (Fig. 2B_b).

1.2.-Contralateral hemisphere (Fig. 2)

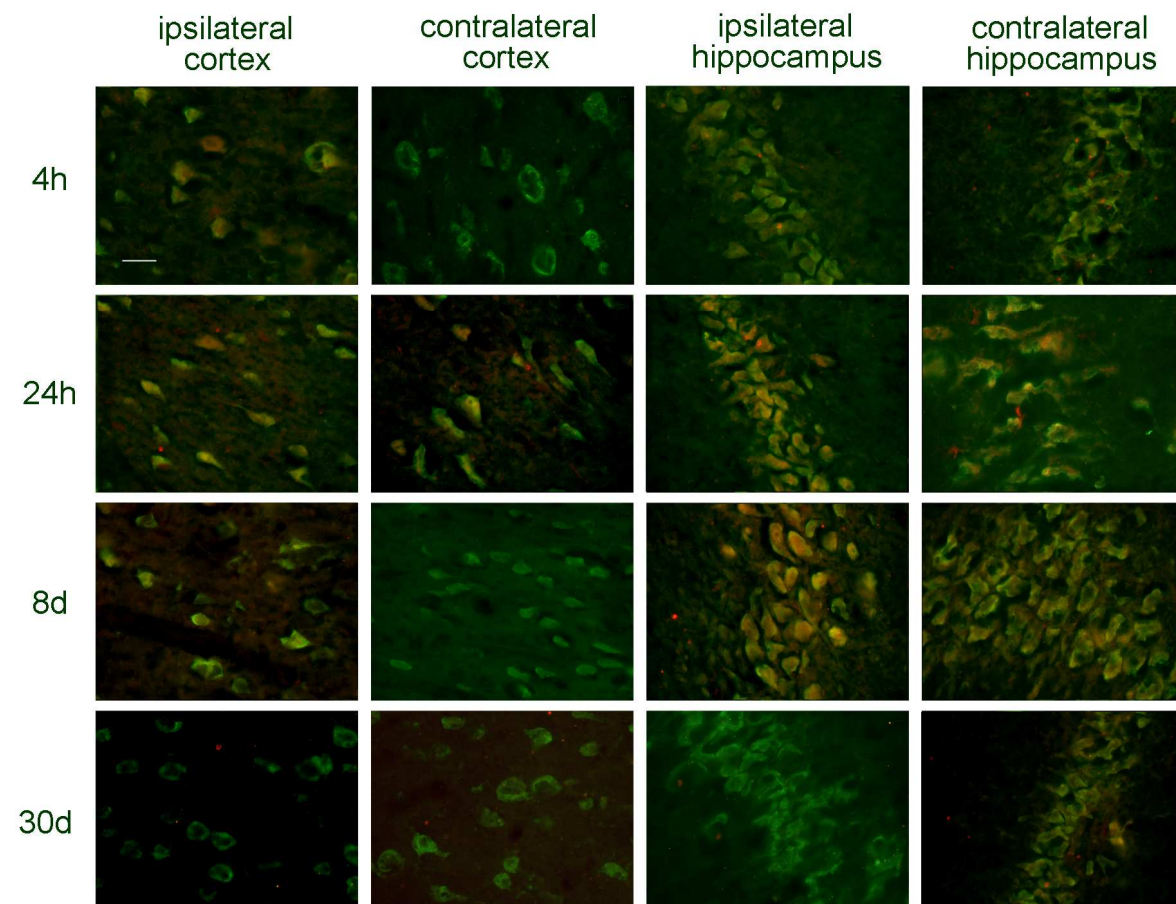


Figure 3 : Immunolocalization of BDNF in neurons following photothrombotic cortical ischemia. Double immunohistofluorescence for BDNF (red) and NeuN (neuronal marker, green) were performed on brain sections 4h, 24h, 8d and 30d after ischemia. Representative pictures of 5 to 7 animals are shown. Scale bar : 50 µm.

2.-Effect of photothrombotic ischemia on BDNF immunoreactivity

In order to characterize the implication of the different brain cells in BDNF expression, immunohistofluorescence for BDNF coupled to NeuN (neurons) or OX-42 (microglia/macrophages) or GFAP (astrocytes) were performed at 4h, 24h, 8d and 30d post-ictus. The pattern of BDNF cellular localization and expression intensity are summarized in Table 1.

2.1.-Ipsilateral hemisphere

Cortical areas

As shown in figures 3, 4 and 5, colocalization experiments indicated that in the cortical area, neurons and microglia exhibited BDNF immunoreactivity (BDNF-IR). At 4h, neuronal staining for BDNF was localized inside the lesioned area while at longer time points (24h

and 8d), most of the staining was restricted to neurons in the surrounding non lesioned cortical region. At these time points, only a few remaining neurons exhibited BDNF-IR within the lesioned cortical area.

Concerning BDNF-IR in microglia (Fig. 4) colocalization experiments indicated that BDNF was expressed in OX-42-positive cells located in the lesioned tissue at 24h post-ictus only. However, this colocalization was only partial since only about a third of microglia expressed BDNF as previously described (Madinier *et al.*, 2009). At longer time points, OX-42 positive cells populating the lesioned area were all BDNF-negative.

Finally, BDNF-IR was detected at 30d post-ictus in astrocytes emerging from the subcortical white matter (corpus callosum) at the base of the cortical lesion (Fig. 5).

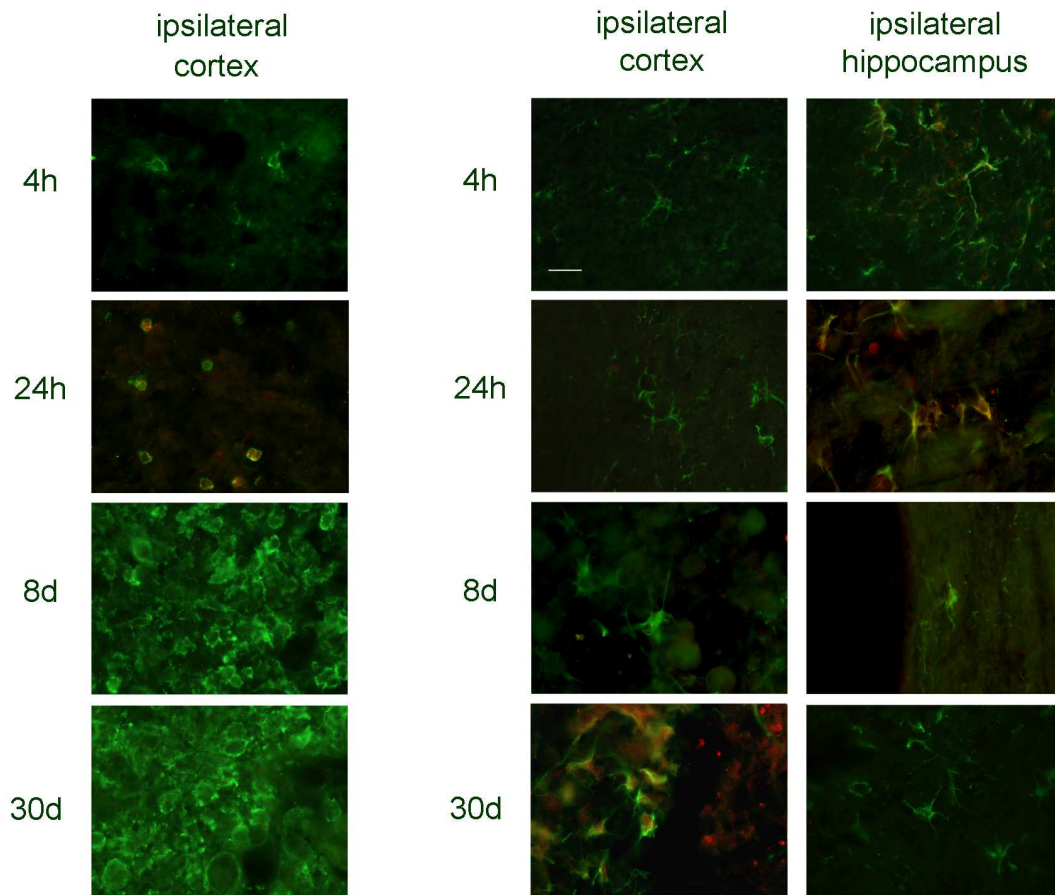


Figure 4 : Immunolocalization of BDNF in microglia following photothrombotic cortical ischemia. Double immunohistofluorescence for BDNF (red) and Ox-42 (microglial marker, green) were performed on brain sections 4h, 24h, 8d and 30d after ischemia. Representative pictures of 5 to 7 animals are shown. Scale bar : 50 μ m.

Figure 5 : Immunolocalization of BDNF in astrocytes following photothrombotic cortical ischemia. Double immunohistofluorescence for BDNF (red) and GFAP (astrocytic marker, green) were performed on brain sections 4h, 24h, 8d and 30d after ischemia. Representative pictures of 5 to 7 animals are shown. Scale bar : 50 μ m.

Table 1 : Semi-quantification of cellular BDNF expression.

| | Neurons | | | |
|-------------|----------------|---------------|--------------------|---------------|
| | Cortex | | Hippocampus | |
| | Ipsi | Contra | Ipsi | Contra |
| Ctrl | - | - | + | + |
| 4h | + | - | ++ | + |
| 24h | +++ | ++ | +++ | ++ |
| 8d | + | - | +++ | +++ |
| 30d | - | - | + | + |

| | Microglia | | | |
|-------------|------------------|---------------|--------------------|---------------|
| | Cortex | | Hippocampus | |
| | Ipsi | Contra | Ipsi | Contra |
| Ctrl | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4h | - | 0 | 0 | 0 |
| 24h | ++ | 0 | 0 | 0 |
| 8d | - | 0 | 0 | 0 |
| 30d | - | 0 | 0 | 0 |

| | Astrocytes | | | |
|-------------|-------------------|---------------|--------------------|---------------|
| | Cortex | | Hippocampus | |
| | Ipsi | Contra | Ipsi | Contra |
| Ctrl | - | - | - | - |
| 4h | - | - | - | - |
| 24h | - | - | + | - |
| 8d | - | - | - | - |
| 30d | ++ | - | - | - |

BDNF staining before and after (4h, 24h, 8d and 30d) photothrombotic cerebral ischemia in neurons, microglia and astrocytes. (0) no cells, (-) no, (+) mild, (++) moderate, (+++) intense BDNF staining (contra: contralateral, ipsi: ipsilateral).

Hippocampal area

In the hippocampus ipsilateral to the lesion, BDNF-IR mainly originates from neurons at 24h and 8d of ischemia since only a few astrocytes were found BDNF positive at 24h post-ictus (Fig. 3 and 4). Colocalization experiments indicated that BDNF expressing neurons and astrocytes were located mainly in the subiculum and at the vicinity of CA₃ in the corpus callosum, respectively.

2.2.-Contralateral hemisphere

In this hemisphere, BDNF-IR was restricted to neurons only. Colocalization experiments showed that in the cortical area, some neurons exhibited BDNF staining at 24h post-ictus. In the hippocampus, neurons of the CA₁ layer exhibited BDNF staining from 24h to 30d with a maximal intensity observed at 8d post-ictus.

DISCUSSION

Our study reveals that photothrombotic ischemia is associated with an early transient increase in

total, pro- and mature BDNF expression in the lesioned cortical area whereas in the surrounding non lesioned area, total BDNF level and mature BDNF expression only were found augmented. According to our immunohistochemistry experiments, these expressions were attributable in these brain regions to neurons and/or microglia. In addition, a BDNF expression was visible in astrocytes at 30d post-ictus. In the hippocampal territory, cerebral ischemia induces a moderate and delayed increase in total, pro- and mature BDNF expression originating mostly from neurons and also astrocytes as compared to the cortical territories. Interestingly, in the contralateral hemisphere, mild but persistent rise in the different forms of BDNF attributable to neurons only were also observed.

Beside its role in supporting neuronal survival and function during development and in the adulthood, BDNF has been reported to exert several potent beneficial effects after an ischemic insult. Indeed, BDNF has been identified as a key molecule in promoting neuroprotection (Schabitz *et al.*, 1997; Wu,

2005), angiogenesis (Kermani & Hempstead, 2007), neurogenesis (Keiner *et al.*, 2009; Schabitz *et al.*, 2007) and synaptic plasticity (Waterhouse & Xu, 2009). Several studies have shown that BDNF delivery after focal ischemia is associated with a decrease in neuronal death (Ferrer *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2011; Schabitz *et al.*, 1997; Yamashita *et al.*, 1997) whereas the blockade of endogenous BDNF activity has been reported to exacerbate post-ischemic neurodegeneration (Larsson *et al.*, 1997). In the line with these studies, our results reporting an increase in total BDNF in the cortical areas of the ipsilateral hemisphere point out the important role of this neurotrophin in the endogenous mechanisms developed by brain cells in order to cope with post-stroke neuronal death. In addition to this crucial role in neuroprotection, different works have been designated to explore BDNF impact on more prolonged and delayed mechanisms such as post-stroke adaptative brain plasticity. In these studies, improvement of functional recovery is most often associated with augmented BDNF levels in perilesional areas (Chen *et al.*, 2005b; Kim *et al.*, 2005; Vaynman *et al.*, 2004). Conversely, attenuating BDNF levels or its effects following cerebral ischemia negates recovery of function induced by rehabilitation (Chen *et al.*, 2005a; Ploughman *et al.*, 2009). In agreement with works showing increases in BDNF levels in brain regions collected at the infarct and peri-infarct level after stroke (Kokaia *et al.*, 1998; Madinier *et al.*, 2009; Sulejczak *et al.*, 2007), our results show that photothrombotic ischemia is associated with an early and transient increase in total BDNF level in lesioned and in the surrounding non lesioned cortical areas. These results are consistent with the important role of BDNF in spontaneous recovery after stroke since using the same model, it has been reported that a decrease in early BDNF synthesis was able to reduce long-term post-ischemic neuroplastic changes (Madinier *et al.*, 2009). Our data also reveal that in the hippocampus, a region distant from the insult, total BDNF was also augmented although this increase was more delayed (24h-8d). According to the fact that cerebral ischemia induces neurogenesis in the subgranular zone of the dentate gyrus (Lichtenwalner & Parent, 2006) and to the participation of BDNF in this process (Kato-Semba *et al.*, 2002), our results showing a delayed and sustained increase in total BDNF provide a further argument in favor of a crucial role of the hippocampus in post-stroke brain plasticity. In addition, in line with an important role of the contralateral hemisphere in recovery process, our study reveals that photothrombotic ischemia induces changes in total BDNF expression in the contralateral

hemisphere although the increase was found more moderate as compared to the lesioned hemisphere. These results are consistent with studies showing an enhanced BDNF production in areas opposite to the lesion site characterized by an increase in BDNF mRNA or in the protein expression in the contralateral hippocampus after focal brain ischemia (Arai *et al.*, 1996; Kokaia *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2005). Moreover, since BDNF expression has been shown to be increased significantly by manipulations that stimulate neuronal activity (Lindholm *et al.*, 1994; Loudes *et al.*, 1999), BDNF enhancement in the contralateral hemisphere is consistent with data showing a post-stroke increase in brain activity of this hemisphere (Takatsuru *et al.*, 2009).

In situ hybridization experiments on animal models of stroke have reported that genes encoding BDNF are specifically induced in neurons (Comelli *et al.*, 1992; Kokaia *et al.*, 1995; Rickhag *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2000) suggesting that these cells represent the preponderant source of BDNF after stroke. However, these studies focus on the acute stage of stroke, and therefore miss the opportunity to detect BDNF mRNA in activated glial cells, which however have been shown to express BDNF (Komitova *et al.*, 2006; Madinier *et al.*, 2009; Sato *et al.*, 2009; Sulejczak *et al.*, 2007). The present study, demonstrating the implication of microglia and astrocytes in stroke-induced BDNF neosynthesis, identifies these cells as potential targets of strategies aiming at improving recovery after stroke. Accordingly, decreases in perilesional BDNF levels by abrogation of early microglial activation reduces neuroplastic changes (Madinier *et al.*, 2009), suggesting that a targeted protection of early activated microglial cells could represent an original option to potentiate post-stroke neuroregenerative responses. In addition, in line with astrocytes as a cellular target of therapeutic interventions after stroke, there is increasing evidences showing that reactive astrocytes through the release of growth factors and related molecule have the potential to remodel neuronal circuitry in the damaged brain (Sofroniew & Vinters, 2010).

The distinction between pro- and mature BDNF expression has been made in conditions of stress-induced alterations of brain function (Tognoli *et al.*, 2010) or of physiological aging in rodents (Obiang *et al.*, 2011) and in several *in vitro* studies (Koshimizu *et al.*, 2010; Mowla *et al.*, 2001). On the other hand, studies designed to investigate the proper effect of cerebral ischemia on the expression of the two BDNF forms are lacking. As stated in the Introduction, this distinction is important since pro-BDNF

biological effects can be opposite to those of mature form. Indeed, although p75^{NTR} can contribute to an increase in neurotrophin affinity and specificity with trkB (Ceni *et al.*, 2010), pro-BDNF through P75^{NTR} receptor activation has been shown to represent a signal leading to apoptosis in neurons (Koshimizu *et al.*, 2009; Teng *et al.*, 2005) and in a variety of systems (Lu *et al.*, 2005). On the contrary, mature BDNF activation of trkB receptors triggers several mechanisms coping with neuronal death (Li *et al.*, 2010) and has been designated to play a central role in many therapeutic rehabilitation interventions (Chen *et al.*, 2005b; Vaynman *et al.*, 2004). Consistently, our results show that in the ipsilateral hemisphere, total BDNF increase is associated with a rise in the expression of both forms at 4h and only the pro-BDNF at 24h in the lesioned cortical area whereas in the non lesioned cortical region, the total BDNF expression is accompanied by an increase in the mature form only. The rise in pro-BDNF expression in the lesion is coherent with the important apoptotic cell death observed at 24h after photothrombotic ischemia (Van Hoecke *et al.*, 2005) while in the non lesioned cortical region, the presence of mature BDNF could facilitate the induction of synaptic plasticity resulting in long lasting changes in the neuronal network of adjacent cortical area as already reported (Carmichael *et al.*, 2003; Madinier *et al.*, 2009). Moreover, mature BDNF expression was found significantly decreased at 8d and 30d. These findings can be related to the important neuronal loss induced by photothrombosis and suggest that the mature BDNF level could represent an index of neuronal density. In the hippocampal territory of the lesioned hemisphere, our results show that pro-BDNF is increased at 8d while the mature form is significantly enhanced at 30d only. According to the importance of this brain structure in the production of BDNF (Cowansage *et al.*, 2010) and in BDNF-related plasticity events (Pang & Lu, 2004; Vaynman *et al.*, 2004) as stated above, it can be hypothesized that in this non lesioned area, a rise in pro-BDNF could be the reflect of an increased gene expression aiming at enhancing mature BDNF levels. This assertion is conceivable in regard of the mature form expression that reaches significance at 30d. Similarly, in the non lesioned hemisphere, our results reveal that variations of both pro- and mature BDNF occurred. Indeed, both forms are expressed at 4h in the cortical area homotopic to the lesion while the expressions of pro- and mature are both statistically augmented at 8d in the hippocampus. This latter exhibits a rise in the mature form at 30d as well. In a similar reasoning, we may postulate that pro-BDNF in

this hemisphere will be processed into mature form as a consequence of an increasing neuronal activity of the non lesioned hemisphere (Kreisel *et al.*, 2005).

Even though our data obtained by ELISA and Western blotting techniques exhibit a quite similar pattern for most of the time points, it is worthwhile to indicate that some of them present on the contrary some disturbing discrepancies. For instance, Elisa analysis in the surrounding non lesioned area of the ipsilateral hemisphere reveals an increase in total BDNF expression whereas concerning our Western blotting data, no statistical increases were observed at this time point and thus whatever the form of BDNF expressed considered. Conversely, expression of mature BDNF assessed by Western blotting has been found statistically enhanced at 30d in the hippocampus of both hemispheres without any detectable total BDNF increase when analysed by enzyme immunoassay. Although difficult to explain, these divergences of results might be attributable to differences in term of antibodies specificity and/or techniques sensitivity. Whatever the reasons, these results underline the requirement in the development of suitable techniques such as enzyme immunoassay or immunohistochemistry that would allow to easily distinguish between pro- and mature BDNF and to determine their respective proportions.

In conclusion, our data raise the question of the pertinence of total BDNF measurements alone and strongly indicate that such assessments have to be coupled with techniques allowing the discrimination of both pro- and mature BDNF. Beside, development of new methodological tools would be essential to improve the understanding of the mechanisms regulating BDNF expression and its subsequent conversion from pro- to mature form. In addition, our results confirm the important role of BDNF in the induction of adaptive mechanisms and argue in favour of a positive contribution of the hippocampal territory and of the contralateral hemisphere in BDNF related post-stroke neuronal circuit remodelling suggesting that strategy of rehabilitation targeting this hemisphere are likely to mediate functional compensation.

REFERENCES

1. Alboni S., Tascetta F., Corsini D., Benatti C., Caggia F., Capone G., Barden N., Blom J.M., Brunello N. (2011) Stress induces altered CRE/CREB pathway activity and BDNF expression in the hippocampus of glucocorticoid receptor-impaired mice. *Neuropharmacology*, 60,1337-46.
2. Arai S., Kinouchi H., Akabane A., Owada Y., Kamii H., Kawase M., Yoshimoto T. (1996) Induction of brain-derived

- neurotrophic factor (BDNF) and the receptor trk B mRNA following middle cerebral artery occlusion in rat. *Neurosci Lett*, 211,57-60.
3. Barde Y.A., Edgar D., Thoenen H. (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *Embo J*, 1,549-53.
 4. Barker P.A. (2009) Whither proBDNF? *Nat Neurosci*, 12,105-6.
 5. Carmichael S.T. (2003) Plasticity of cortical projections after stroke. *Neuroscientist*, 9,64-75.
 6. Ceni C., Kommaddi R.P., Thomas R., Vereker E., Liu X., McPherson P.S., Ritter B., Barker P.A. (2010) The p75NTR intracellular domain generated by neurotrophin-induced receptor cleavage potentiates Trk signaling. *J Cell Sci*, 123,2299-307.
 7. Chen J., Zacharek A., Zhang C., Jiang H., Li Y., Roberts C., Lu M., Kapke A., Chopp M. (2005b) Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci*, 25,2366-75.
 8. Chen J., Zhang C., Jiang H., Li Y., Zhang L., Robin A., Katakowski M., Lu M., Chopp M. (2005a) Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25,281-90.
 9. Comelli M.C., Seren M.S., Guidolin D., Manev R.M., Favaron M., Rimland J.M., Canella R., Negro A., Manev H. (1992) Photochemical stroke and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression. *Neuroreport*, 3,473-6.
 10. Cowansage K.K., LeDoux J.E., Monfils M.H. (2010) Brain-derived neurotrophic factor: a dynamic gatekeeper of neural plasticity. *Curr Mol Pharmacol*, 3,12-29.
 11. Fellstrom B., Akyurek M.L., Larsson F., Waltenberger J., Wanders A., Funke K. (1997) Ischemia induced upregulation of growth factor expression in experimental transplant arteriosclerosis. *Transplant Proc*, 29,2558.
 12. Ferrer I., Krupinski J., Goutan E., Marti E., Ambrosio S., Arenas E. (2001) Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neuropathol*, 101,229-38.
 13. Han Q., Li B., Feng H., Xiao Z., Chen B., Zhao Y., Huang J., Dai J. (2011) The promotion of cerebral ischemia recovery in rats by laminin-binding BDNF. *Biomaterials*, 32,5077-85.
 14. Horch H.W., Katz L.C. (2002) BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci*, 5,1177-84.
 15. Horch H.W., Kruttgen A., Portbury S.D., Katz L.C. (1999) Destabilization of cortical dendrites and spines by BDNF. *Neuron*, 23,353-64.
 16. Hsu C.Y., An G., Liu J.S., Xue J.J., He Y.Y., Lin T.N. (1993) Expression of immediate early gene and growth factor mRNAs in a focal cerebral ischemia model in the rat. *Stroke*, 24,178-81.
 17. Huang E.J., Reichardt L.F. (2003) Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 72,609-42.
 18. Kato-Semba R., Asano T., Ueda H., Morishita R., Takeuchi I.K., Inaguma Y., Kato K. (2002) Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *Faseb J*, 16,1328-30.
 19. Keiner S., Witte O.W., Redecker C. (2009) Immunocytochemical detection of newly generated neurons in the perilesional area of cortical infarcts after intraventricular application of brain-derived neurotrophic factor. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68,83-93.
 20. Kermani P., Hempstead B. (2007) Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 17,140-3.
 21. Kim M.W., Bang M.S., Han T.R., Ko Y.J., Yoon B.W., Kim J.H., Kang L.M., Lee K.M., Kim M.H. (2005) Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Res*, 1052,16-21.
 22. Kokaia Z., Andberg G., Yan Q., Lindvall O. (1998) Rapid alterations of BDNF protein levels in the rat brain after focal ischemia: evidence for increased synthesis and anterograde axonal transport. *Exp Neurol*, 154,289-301.
 23. Kokaia Z., Zhao Q., Kokaia M., Elmer E., Metsis M., Smith M.L., Siesjo B.K., Lindvall O. (1995) Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp Neurol*, 136,73-88.
 24. Komitova M., Perfilieva E., Mattsson B., Eriksson P.S., Johansson B.B. (2006) Enriched environment after focal cortical ischemia enhances the generation of astroglia and NG2 positive polydendrocytes in adult rat neocortex. *Exp Neurol*, 199,113-21.
 25. Koshimizu H., Hazama S., Hara T., Ogura A., Kojima M. (2010) Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett*, 473,229-32.
 26. Koshimizu H., Kiyosue K., Hara T., Hazama S., Suzuki S., Uegaki K., Nagappan G., Zaitsev E., Hirokawa T., Tatsu Y., Ogura A., Lu B., Kojima M. (2009) Multiple functions of precursor BDNF to CNS neurons: negative regulation of neurite growth, spine formation and cell survival. *Mol Brain*, 2,27.
 27. Kreisel S.H., Bazner H., Hennerici M.G. (2006) Pathophysiology of stroke rehabilitation: temporal aspects of neuro-functional recovery. *Cerebrovasc Dis*, 21,6-17.
 28. Larsson E., Nanobashvili A., Kokaia Z., Lindvall O. (1999) Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19,1220-8.
 29. Lee R., Kermani P., Teng K.K., Hempstead B.L. (2001) Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 294,1945-8.
 30. Li B., Piao C.S., Liu X.Y., Guo W.P., Xue Y.Q., Duan W.M., Gonzalez-Toledo M.E., Zhao L.R. (2010) Brain self-protection: the role of endogenous neural progenitor cells in adult brain after cerebral cortical ischemia. *Brain Res*, 1327,91-102.
 31. Lichtenwalner R.J., Parent J.M. (2006) Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26,1-20.
 32. Lindholm D., Castren E., Berzaghi M., Blochl A., Thoenen H. (1994) Activity-dependent and hormonal regulation of neurotrophin mRNA levels in the brain--implications for neuronal plasticity. *J Neurobiol*, 25,1362-72.
 33. Loudes C., Petit F., Kordon C., Faivre-Bauman A. (1999) Distinct populations of hypothalamic dopaminergic neurons exhibit differential responses to brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT3). *Eur J Neurosci*, 11,617-24.
 34. Lu B., Pang P.T., Woo N.H. (2005) The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci*, 6,603-14.
 35. Madinier A., Bertrand N., Mossiat C., Prigent-Tessier A., Beley A., Marie C., Garnier P. (2009) Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PLoS One*, 4,e8101.
 36. McAllister A.K., Lo D.C., Katz L.C. (1995) Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron*, 15,791-803.
 37. Melin J., Hellberg O., Akyurek L.M., Kallskog O., Larsson E., Fellstrom B.C. (1997) Ischemia causes rapidly progressive nephropathy in the diabetic rat. *Kidney Int*, 52,985-91.

38. Mowla S.J., Farhadi H.F., Pareek S., Atwal J.K., Morris S.J., Seidah N.G., Murphy R.A. (2001) Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*, 276,12660-6.
39. Obiang P., Maubert E., Bardou I., Nicole O., Launay S., Bezin L., Vivien D., Agin V. (2011) Enriched housing reverses age-associated impairment of cognitive functions and tPA-dependent maturation of BDNF. *Neurobiol Learn Mem*,
40. Pang P.T., Lu B. (2004) Regulation of late-phase LTP and long-term memory in normal and aging hippocampus: role of secreted proteins tPA and BDNF. *Ageing Res Rev*, 3,407-30.
41. Patterson S.L., Abel T., Deuel T.A., Martin K.C., Rose J.C., Kandel E.R. (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron*, 16,1137-45.
42. Ploughman M., Windle V., MacLellan C.L., White N., Dore J.J., Corbett D. (2009) Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke*, 40,1490-5.
43. Rickhag M., Teilmann M., Wieloch T. (2007) Rapid and long-term induction of effector immediate early genes (BDNF, *Neuritin* and *Arc*) in peri-infarct cortex and dentate gyrus after ischemic injury in rat brain. *Brain Res*, 1151,203-10.
44. Rosch H., Schweigreiter R., Bonhoeffer T., Barde Y.A., Korte M. (2005) The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102,7362-7.
45. Sato Y., Chin Y., Kato T., Tanaka Y., Tozuka Y., Mase M., Agetama N., Ono F., Terao K., Yoshikawa Y., Hisatsune T. (2009) White matter activated glial cells produce BDNF in a stroke model of monkeys. *Neurosci Res*, 65,71-8.
46. Schabitz W.R., Schwab S., Spranger M., Hacke W. (1997) Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17,500-6.
47. Schabitz W.R., Steigleder T., Cooper-Kuhn C.M., Schwab S., Sommer C., Schneider A., Kuhn H.G. (2007) Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke*, 38,2165-72.
48. Sofroniew M.V., Vinters H.V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119,7-35.
49. Squinto S.P., Stitt T.N., Aldrich T.H., Davis S., Bianco S.M., Radziejewski C., Glass D.J., Masiakowski P., Furth M.E., Valenzuela D.M., et al. (1991) *trkB* encodes a functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell*, 65,885-93.
50. Sulejczak D., Ziemińska E., Czarkowska-Bauch J., Nosecka E., Strzalkowski R., Skup M. (2007) Focal photothrombotic lesion of the rat motor cortex increases BDNF levels in motor-sensory cortical areas not accompanied by recovery of forelimb motor skills. *J Neurotrauma*, 24,1362-77.
51. Takatsuru Y., Fukumoto D., Yoshitomo M., Nemoto T., Tsukada H., Nabekura J. (2009) Neuronal circuit remodeling in the contralateral cortical hemisphere during functional recovery from cerebral infarction. *J Neurosci*, 29,10081-6.
52. Tanaka J., Horiike Y., Matsuzaki M., Miyazaki T., Ellis-Davies G.C., Kasai H. (2008) Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. *Science*, 319,1683-7.
53. Teng H.K., Teng K.K., Lee R., Wright S., Tevar S., Almeida R.D., Kermani P., Torkin R., Chen Z.Y., Lee F.S., Kraemer R.T., Nykjaer A., Hempstead B.L. (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci*, 25,5455-63.
54. Tognoli C., Rossi F., Di Cola F., Baj G., Tongiorgi E., Terova G., Saroglia M., Bernardini G., Gornati R. (2010) Acute stress alters transcript expression pattern and reduces processing of proBDNF to mature BDNF in *Dicentrarchus labrax*. *BMC Neurosci*, 11,4.
55. Van Hoecke M., Prigent-Tessier A., Bertrand N., Prevotat L., Marie C., Beley A. (2005) Apoptotic cell death progression after photothrombotic focal cerebral ischaemia: effects of the lipophilic iron chelator 2,2'-dipyridyl. *Eur J Neurosci*, 22,1045-56.
56. Vaynman S., Ying Z., Gomez-Pinilla F. (2004) Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci*, 20,2580-90.
57. Waterhouse E.G., Xu B. (2009) New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci*, 42,81-9.
58. Woo N.H., Teng H.K., Siao C.J., Chiaruttini C., Pang P.T., Milner T.A., Hempstead B.L., Lu B. (2005) Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci*, 8,1069-77.
59. Wu D. (2005) Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *NeuroRx*, 2,120-8.
60. Yamashita K., Wiessner C., Lindholm D., Thoenen H., Hossmann K.A. (1997) Post-occlusion treatment with BDNF reduces infarct size in a model of permanent occlusion of the middle cerebral artery in rat. *Metab Brain Dis*, 12,271-80.
61. Zhang Y., Pardridge W.M. (2001) Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system. *Stroke*, 32,1378-84.
62. Zhao L.R., Mattsson B., Johansson B.B. (2000) Environmental influence on brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience*, 97,177-84.

Résumé, conclusion
et perspectives

Ce travail avait pour objectif de mieux caractériser la réponse microgliale post-ischémique et de comprendre dans quelle mesure ces cellules pouvaient être impliquées dans l'induction de changements neuroplastiques. Parmi les molécules potentiellement capables d'induire de tels changements, le BDNF a émergé comme un candidat potentiel au vu des nombreuses études démontrant son implication dans les processus neuroplastiques (Bessis *et al.*, 2007 ; Schabitz *et al.*, 2007 ; Mattson, 2008). Dans un deuxième temps, le métabolisme complexe de cette neurotrophine à travers l'existence de deux formes, pro- et mature, aux effets biologiques opposés (Lu *et al.*, 2005), nous a conduit à nous intéresser aux expressions totale ainsi que des formes pro- et mature du BDNF en réponse à une ischémie cérébrale induite par photothrombose.

En dépit de progrès notables dans la compréhension des mécanismes d'activation, de prolifération, de production de cytokines ou de facteurs de croissance, le rôle de la réponse microgliale post-ischémique est toujours sujet à controverses (Feuerstein & Wang, 2001 ; Marchetti & Abbracchio, 2005 ; Ekdahl *et al.*, 2009). Même si des travaux se sont intéressés à l'impact de ces cellules sur la neurogenèse, peu d'études ont été réalisées dans le but de déterminer le rôle de ces cellules sur d'autres paramètres de la neuroplasticité tels que la croissance axonale et la synaptogenèse. Dans ce contexte, nous avons tout d'abord cherché à moduler la réponse microgliale post-ischémique. En raison du rôle joué par la protéine PARP-1 dans le déclenchement de cette réponse (Chiarugi & Moskowitz, 2003 ; Kauppinen & Swanson, 2007), nous avons choisi d'inhiber l'activité de cette protéine par le biais de l'utilisation d'un inhibiteur spécifique, le 3-AB. Cependant, sachant que l'activation post-ischémique de PARP-1 ne se limite pas à une modulation de la réponse inflammatoire puisque la sur-activation de cette protéine est connue pour participer à la mort neuronale en réponse à un AVC expérimental (Szabo & Dawson, 1998), notre objectif a été d'utiliser une dose d'inhibiteur de PARP-1 ne ciblant que la composante inflammatoire post-ischémique. Le choix de s'affranchir d'un effet neuroprotecteur a été essentiel car il est bien établi que l'intensité des dommages neuronaux est corrélée à l'intensité de la réponse inflammatoire et il aurait été par la suite délicat d'interpréter nos résultats en ayant une diminution de la réponse microgliale associée à une neuroprotection. Sur la base des données de la littérature montrant qu'au-delà de 80 mg/kg, le 3-AB n'avait plus d'effet neuroprotecteur (Couturier *et al.*, 2003), nous avons utilisé une dose de 3-AB de 90 mg/kg qui n'a pas modulé le volume de la zone infarctée. Cependant, afin de s'assurer que le traitement au 3-AB n'avait pas favorisé une transition d'une mort nécrotique vers une mort apoptotique, nous avons à 24h post-ictus,

lorsque le volume de lésion est maximal, caractérisé histologiquement la mort neuronale. Nos résultats, présentés dans la figure 23, montrent que le traitement au 3-AB n'a induit aucune modification dans la proportion des différentes formes de mort neuronale présentes au sein de la zone infarctée. Par contre, ce traitement a été très efficace dans la modulation de la réponse microgliale précoce avec une diminution importante du nombre de cellules microgliales activées. L'analyse des expressions à long terme de protéines marqueurs de croissance axonale (GAP-43) et de synaptogenèse (synaptophysine) a révélé que cette modulation précoce avait un impact à long terme sur ces événements neuroplastiques, suggérant que les cellules microgliales ont une place importante dans l'induction des mécanismes adaptatifs induits en réponse à une ischémie cérébrale.

Ayant ciblé le BDNF comme candidat potentiellement capable de promouvoir de tels changements, nous avons pu mettre en évidence que ces cellules représentaient de façon précoce une source cellulaire importante de BDNF. Ces résultats ont été confirmés par la nette diminution des taux de BDNF mesurés dans les zones corticales lésionnelles et péri-lésionnelles des animaux traités par le 3-AB associée à une moindre expression des protéines marqueurs de neuroplasticité. Nos résultats suggèrent donc l'implication des cellules microgliales dans l'induction de processus cérébraux adaptatifs via la production de BDNF. Cependant, même si le BDNF semble jouer un rôle dans ce phénomène, d'autres molécules synthétisées par ces cellules pourraient être impliquées dans ces processus. Il a en effet été montré que les autres neurotrophines (NGF, NT-3, NT-4/5) (Elkabes *et al.*, 1996 ; Nakajima *et al.*, 2007) ou d'autres protéines sécrétées telles que l'IGF-1, l'EPO, le GDNF ou les thrombospondines favorisent la mise en place des changements plastiques (Wang *et al.*, 2004 ; Komitova *et al.*, 2006 ; Weiloch & Nikolich, 2006). Certaines protéases telles que les MMP en participant au remodelage de la MEC pourraient aussi participer au rétablissement du réseau neuronal à proximité de la zone lésée (del Zoppo *et al.*, 2007). L'ensemble de ces résultats tend à conférer aux cellules microgliales un rôle de support trophique en réponse à un AVC expérimental. Néanmoins, nos résultats d'immunolocalisation ont mis en évidence que seulement environ un tiers des cellules microgliales exprimaient le BDNF. D'autre part, de nombreuses études ont également démontré le caractère délétère de l'activation microgliale à travers l'expression de cytokines pro-inflammatoires, la production de protéases ou de RL (Bottchikina *et al.*, 1997 ; Sairanen *et al.*, 1997 ; Amantea *et al.*, 2009). Il est donc concevable, au vu du caractère ambivalent de la réponse microgliale, d'imaginer qu'au sein de la zone lésée coexistent plusieurs populations de cellules microgliales dont l'activation conduit à des

effets biologiques opposés. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons tenté de discriminer ces populations en réalisant un double marquage dirigé contre les récepteurs aux chémokines CXCR3 et CCR9. Ce choix a été basé sur les résultats d'une étude *in vitro* montrant que les cellules microgliales exprimant ces récepteurs adoptaient des phénotypes opposés (Li *et al.*, 2006). Cependant, nos expériences de mise au point se sont révélées infructueuses et ne nous ont pas permis de conclure sur ce point. Néanmoins, l'ensemble de nos résultats sont en accord avec l'évolution du concept proposant un rôle potentiellement favorable de la réaction inflammatoire post-ischémique. Il paraît dès lors envisageable de développer des stratégies pharmacologiques visant à orienter les cellules microgliales vers un phénotype neuroprotecteur et de soutien des changements neuroplastiques tout en minimisant l'activation des cellules adoptant un phénotype délétère. Même si des avancées récentes ont été réalisées quant à la compréhension des mécanismes responsables de l'activation des cellules microgliales, notamment via une activité caspase non létale (Burguillos *et al.*, 2011), les travaux portant sur les mécanismes conduisant à la mort des cellules microgliales sont peu nombreux. De tels travaux pourraient amener la communauté scientifique à proposer également des stratégies de "glioprotection".

Au cours de cette première étude, nous avons également travaillé sur la discrimination des expressions des formes pro- et mature du BDNF. Cette mise au point était nécessaire car la technique ELISA ne nous donnait qu'un aperçu global des variations du BDNF total (pro- + mature) sans tenir compte des effets divergents de ces deux formes. Ces expériences ont nécessité l'utilisation de nombreux anticorps (Santa Cruz, Microm, Millipore, Epitomics) et ce n'est que récemment que nous avons pu, via l'utilisation d'un nouvel anticorps monoclonal de lapin (Epitomics), différencier sans ambiguïté les formes pro- et mature de cette neurotrophine. L'acquisition de cette technique nous a permis de réaliser une étude spatio-temporelle des expressions des deux formes de BDNF en réponse à une ischémie cérébrale. La mesure de ces expressions a été réalisée au niveau et à proximité de la zone corticale lésée ainsi que dans le territoire hippocampique. De plus, nous nous sommes également intéressés aux variations d'expressions dans l'hémisphère controlatéral. Aux temps courts, nos résultats montrent que dans la zone corticale lésée, l'ischémie cérébrale induit une augmentation des expressions des 2 formes de BDNF à 4h et uniquement de la forme pro- à 24h. Dans la zone péri-lésionnelle, nos analyses révèlent que seul le BDNF mature voit son expression augmentée. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature concernant les significations biologiques des formes pro- et mature de cette neurotrophine. En effet,

l'augmentation du pro-BDNF dans la zone lésée à 24h post-ictus peut être reliée à son action pro-apoptotique et sont en accord avec la proportion importante de mort neuronale apoptotique induite par ce modèle d'ischémie. A l'opposé, dans le territoire péri-lésionnel, nos analyses ont révélé que seule la forme mature du BDNF était augmentée, cette variation pouvant être reliée à l'induction de changements neuroplastiques observés dans notre première étude. Aux temps longs, de manière intéressante, nos résultats mettent en évidence que l'expression de la forme mature du BDNF est significativement diminuée au sein de la zone lésée, suggérant que le BDNF mature pourrait représenter un index de viabilité neuronale.

Notre étude indique également que l'ischémie cérébrale induit des variations d'expression du BDNF dans des régions distantes de la zone infarctée. En effet, dans l'hippocampe ipsilatéral à la lésion, nos résultats montrent une augmentation de la forme pro- à 8 j et de la forme mature à 30 j. De plus, dans l'hémisphère controlatéral, nos données révèlent une augmentation précoce (4h) des expressions des formes pro- et mature dans la zone cortical homotopique à la zone lésée alors que dans l'hippocampe des variations plus retardées sont également observées avec une augmentation des 2 formes à 8 j et de la forme mature à 30 j. Dans ces régions non lésées, la présence de la forme pro- est probablement le reflet d'une augmentation de l'expression du gène dont le but est à terme d'augmenter la production de la forme mature du BDNF. En effet, il est bien établi que le BDNF mature joue un rôle dans les mécanismes de neurogenèse associés à la zone sous granulaire de l'hippocampe (Kato-Semba *et al.*, 2002). Dans l'hémisphère controlatéral, ces variations pourraient participer à l'induction des mécanismes de remodelage des circuits neuronaux observés dans cet hémisphère (Takatsuru *et al.*, 2009). D'un point de vue cellulaire, nos données confirment que les neurones représentent une source importante de BDNF mais soulignent également que les cellules microgliales et les astrocytes prennent part de manière significative à la production de cette neurotrophine, suggérant que les stratégies ciblant ces cellules peuvent se révéler efficaces avec, pour les astrocytes (positifs à 30 j dans le cortex ipsilatéral à la lésion), l'avantage d'offrir une fenêtre thérapeutique plus étendue. En résumé, cette étude spatio-temporelle des expressions des formes pro- et mature du BDNF tend à confirmer l'implication de cette neurotrophine dans les mécanismes adaptatifs induits en réponse à une ischémie cérébrale et suggèrent que les territoires distants de la zone lésée jouent un rôle majeur dans ces processus. De plus, nos résultats confirment ceux obtenus dans

une étude réalisée récemment au sein du laboratoire mettant en évidence que les cellules non neuronales représentent une source de BDNF non négligeable (Bejot *et al.*, 2011).

Cependant, il est important de souligner que l'étude de l'expression de cette neurotrophine reste délicate. En effet, l'examen attentif des variations du BDNF total (estimées par technique ELISA) et des variations des différentes formes de BDNF (mesurées par Western blotting) fait parfois apparaître des divergences importantes. Ainsi, l'augmentation de l'expression de la forme mature dans les territoires hippocampiques n'est pas associée à une élévation du taux de BDNF mesuré par ELISA. A l'inverse, dans la zone corticale péri-lésionnelle, l'augmentation des taux de BDNF à 24h ne s'accompagne pas d'une augmentation d'expression de l'une ou l'autre des formes du BDNF. Ces divergences, difficiles à expliquer en dehors de possibles différences de sensibilité ou spécificité des techniques et/ou des anticorps utilisés, nous amènent à remettre en question la pertinence de la technique ELISA dans l'étude de cette neurotrophine, surtout lors de la caractérisation de son impact sous sa forme mature dans les mécanismes neuroplastiques. De plus, quant à la discrimination des deux formes exprimées et à leur signification biologique, il est important de souligner que nos analyses sont réalisées dans des homogénats cérébraux contenant un mélange à la fois de milieu intracellulaire (~ 80 %) et de milieu extracellulaire (~ 20 %) ne nous permettant pas de savoir si ces formes sont réellement sécrétées et donc biologiquement actives. Une suite logique de ce travail constituerait à analyser par immunohistochimie et par Western blotting, les expressions des récepteurs p75^{NTR} et trkB afin de vérifier si la synthèse des 2 formes de BDNF s'accompagne effectivement de l'expression de leurs récepteurs spécifiques. De tels résultats pourraient nous donner des arguments supplémentaires nous permettant de mieux interpréter la signification biologique des variations observées dans l'expression des 2 formes. Quoi qu'il en soit, même si nos données révèlent la difficulté d'étude de cette neurotrophine, de nouveaux projets visant à comprendre l'effet d'un AVC expérimental sur le métabolisme du BDNF au niveau des vaisseaux cérébraux ainsi que les mécanismes à l'origine de la conversion de la forme pro- vers la forme mature sont actuellement en cours de réalisation au sein du laboratoire.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats fournit des arguments en faveur du rôle bénéfique de la réponse inflammatoire post-ischémique et en particulier sur l'implication de l'activation microgliale dans le déclenchement de la neuroplasticité. Bien que les mécanismes exacts qui entrent en jeu restent à déterminer précisément, nos études sur le BDNF plaident en

faveur de son implication dans le déclenchement de la neuroplasticité post-ischémique. La caractérisation précise du phénotype de la microglie activée au cours de l'ischémie, ainsi que la détermination exacte de la nature des composés qu'elle synthétise et leur rôle dans la mise en place de la plasticité neuronale constituent les prochaines étapes dans le développement de traitement permettant de lutter contre les séquelles de l'AVC.

Bibliographie

- Abraham H. & Lazar G. (2000) Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res*, 862, 63-73.
- Abraham H., Somogyvari-Vigh A., Maderdrut J.L., Vigh S. & Arimura A. (2003) Rapidly activated microglial cells in the preoptic area may play a role in the generation of hyperthermia following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *Exp Brain Res*, 153, 84-91.
- Abraham C., Hutter H., Palfreyman M.T., Spatkowski G., Weimer R.M., Windoffer R., Jorgensen E.M. & Leube R.E. (2006) Synaptic tetraspan vesicle membrane proteins are conserved but not needed for synaptogenesis and neuronal function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 8227-8232.
- Alano C.C., Garnier P., Ying W., Higashi Y., Kauppinen T.M. & Swanson R.A. (2010) NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *J Neurosci*, 30, 2967-2978.
- Albelda S.M. (1991) Endothelial and epithelial cell adhesion molecules. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 4, 195-203.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. New York : Garland Science, 2007.
- Alenzi F.Q., Lotfy M. & Wyse R. (2010) Swords of cell death: caspase activation and regulation. *Asian Pac J Cancer Prev*, 11, 271-280.
- Allan S.M. & Rothwell N.J. (2003) Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358, 1669-1677.
- Alliot F., Lecain E., Grima B. & Pessac B. (1991) Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 1541-1545.
- Alliot F., Godin I. & Pessac B. (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 117, 145-152.
- Aloisi F. (2001) Immune function of microglia. *Glia*, 36, 165-179.
- Althaus F.R. & Richter C. (1987) ADP-ribosylation of proteins. Enzymology and biological significance. *Mol Biol Biochem Biophys*, 37, 1-237.
- Altmeyer M. & Hottiger M.O. (2009) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 at the crossroad of metabolic stress and inflammation in aging. *Aging (Albany NY)*, 1, 458-469.
- Altmeyer M., Messner S., Hassa P.O., Fey M. & Hottiger M.O. (2009) Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res*, 37, 3723-3738.
- Amantea D., Corasaniti M.T., Mercuri N.B., Bernardi G. & Bagetta G. (2008) Brain regional and cellular localization of gelatinase activity in rat that have undergone transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience*, 152, 8-17.
- Amantea D., Nappi G., Bernardi G., Bagetta G. & Corasaniti M.T. (2009) Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *Febs J*, 276, 13-26.
- Ame, J.C., Spenlehauer, C. & de Murcia, G. (2004) The PARP superfamily. *Bioessays*, 26, 882-893.
- Amoureux M.C., Cunningham B.A., Edelman G.M. & Crossin K.L. (2000) N-CAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J Neurosci*, 20, 3631-3640.
- Andermarcher E., Bossis G., Farras R., Jariel-Encontre I. & Piechaczyk M. (2005) [Proteasomal degradation: from addressing of substrates to therapeutical perspectives]. *Med Sci (Paris)*, 21, 141-149.
- Andrabi S.A., Kim N.S., Yu S.W., Wang H., Koh D.W., Sasaki M., Klaus J.A., Otsuka T., Zhang Z., Koehler R.C., Hurn P.D., Poirier G.G., Dawson V.L. & Dawson, T.M. (2006) Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18308-18313.
- Ango F., di Cristo G., Higashiyama H., Bennett V., Wu, P. & Huang Z.J. (2004) Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell*, 119, 257-272.

-A-

- Arumugam T.V., Granger D.N. & Mattson M.P. (2005) Stroke and T-cells. *Neuromolecular Med*, 7, 229-242.
- Arundine M. & Tymianski M. (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34,325-337.
- Arvidsson A., Collin T., Kirik D., Kokaia Z. & Lindvall, O. (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*. 8, 963-970.
- Asahara, T. & Kawamoto, A. (2004) Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287, C572-579.
- Astrup J., Siesjö B.K. & Symon, L. (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*, 12, 723-725.
- Bai F., Bergeron M. & Nelson D.L. (2003) Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 44, 1013-1021.
- Barbacid M. (1995) Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 766, 442-458.
- Bargatze R.F., Kurk S., Butcher E.C. & Jutila M.A. (1994) Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. *J Exp Med*, 180, 1785-1792.
- Barone F.C., Arvin B., White R.F., Miller A., Webb C.L., Willette R.N., Lysko P.G. & Feuerstein G.Z. (1997) Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke*, 28, 1233-1244.
- Baron-Van Evercooren A., Avellana-Adalid V., Ben Younes-Chennoufi A., Gansmuller A., Nait-Oumesmar B. & Vignais L. (1996) Cell-cell interactions during the migration of myelin-forming cells transplanted in the demyelinated spinal cord. *Glia*, 16, 147-164.
- Batchelor P.E., Porritt M.J., Martinello P., Parish C.L., Liberatore G.T., Donnan G.A. & Howells D.W. (2002) Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge. *Mol Cell Neurosci*, 21,436-53.
- Batchelor P.E., Wills T.E., Hewa A.P., Porritt M.J., Howells D.W. (2008) Stimulation of axonal sprouting by trophic factors immobilized within the wound core. *Brain Res*, 1209,49-56.
- Beck T., Lindholm D., Castren E. & Wree A. (1994) Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*, 14, 689-692.
- Beck H., Acker T., Puschel A.W., Fujisawa H., Carmeliet P. & Plate K.H. (2002) Cell type-specific expression of neuropilins in an MCA-occlusion model in mice suggests a potential role in post-ischemic brain remodeling. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61, 339-350.
- Beckman J.S. & Koppenol W.H. (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol*, 271, C1424-1437.
- Bedard K. & Krause K.H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87,245-313.
- Bejot Y., Prigent-Tessier A., Cachia C., Giroud M., Mossiat C., Bertrand N., Garnier P. & Marie C. (2011) Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochem int*, 58, 102-111.
- Bellinger F.P., Madamba S. & Siggins G.R. (1993) Interleukin 1 beta inhibits synaptic strength and long-term potentiation in the rat CA1 hippocampus. *Brain Res*, 628, 227-234.
- Bellinger F.P., Madamba S.G., Campbell I.L. & Siggins G.R. (1995) Reduced long-term potentiation in the dentate gyrus of transgenic mice with cerebral overexpression of interleukin-6. *Neurosci Lett*, 198, 95-98.
- Belvindrah R., Rougon G. & Chazal G. (2002) Increased neurogenesis in adult mCD24-deficient mice. *J Neurosci*, 22, 3594-3607.
- Benjamin R.C. & Gill D.M. (1980) Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks. *J Biol Chem*, 255, 10502-10508.
- Berger N.A. & Berger S.J. (1986) Metabolic consequences of DNA damage: the role of poly (ADP-ribose) polymerase as mediator of the suicide response. *Basic Life Sci*, 38, 357-363.
- Bernabeu R. & Sharp F.R. (2000) NMDA and AMPA/kainate glutamate receptors modulate dentate neurogenesis and CA3 synapsin-I in normal and ischemic hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20, 1669-1680.

- Bernaudin M., Marti H.H., Roussel S., Divoux D., Nouvelot A., MacKenzie E.T. & Petit E. (1999) A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 19, 643-651.
- Bessis A., Bechade C., Bernard D. & Roumier A. (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, 55,233-238.
- Biederer T., Sara Y., Mozhayeva M., Atasoy D., Liu X., Kavalali E.T. & Sudhof T.C. (2002) SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science*, 297, 1525-1531.
- Boquillon M., Boquillon J.P. & Bralet J. (1992) Photochemically induced, graded cerebral infarction in the mouse by laser irradiation evolution of brain edema. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 27,1-6.
- Bordet R., Ouk T., Onteniente B., Charriaut-Marlangue C. & Heurteaux C. (2009) [Cerebral ischaemia: tomorrow's therapeutic tracks]. *Med Sci (Paris)*, 25, 847-854.
- Botchkina G.I., Meistrell M.E. 3rd, Botchkina I.L. & Tracey K.J. (1997) Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med*, 3, 765-781.
- Bouquet C., Soares S., von Boxberg Y., Ravaille-Veron M., Propst F. & Nothias F. (2004) Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci*, 24, 7204-7213.
- Bredt D.S. & Snyder S.H. (1994) Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*, 63, 175-195.
- Brennan R.G. & Matthews B.W. (1989) The helix-turn-helix DNA binding motif. *J Biol Chem*, 264, 1903-1906.
- Brennan A.M., Suh S.W., Won S.J., Narasimhan P., Kauppinen T.M., Lee H., Edling Y., Chan P.H. & Swanson R.A. (2009) NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci*, 12,857-863.
- Brenneman M.M., Wagner S.J., Cheatwood J.L., Heldt S.A., Corwin J.V., Reep R.L., Kartje G.L., Mir A.K. & Schwab M.E. (2008) Nogo-A inhibition induces recovery from neglect in rats. *Behav Brain Res*, 187,262-272.
- Brose K. & Tessier-Lavigne M. (2000) Slit proteins: key regulators of axon guidance, axonal branching, and cell migration. *Curr Opin Neurobiol*, 10, 95-102.
- Brown R.E. (2006) The life and work of Donald Olding Hebb. *Acta Neurol Taiwan*, 15,127-142.
- Brune B., Zhou J. & von Knethen A. (2003) Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int Suppl*, S22-24.
- Burguillos M.A., Deierborg T., Kavanagh E., Persson A., Hajji N., Garcia-Quintanilla A., Cano J., Brundin P., Englund E., Venero J.L. & Joseph B. (2011) Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature*, 472,319-324.
- Burkle A. (2001) Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays*, 23, 795-806.
- Busch H.J., Buschmann I.R., Mies G., Bode C. & Hossmann K.A. (2003) Arteriogenesis in hypoperfused rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 23, 621-628.
- Cadenas E. & Davies K.J. (2000) Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 29, 222-230.
- Callapina M., Zhou J., Schmid T., Kohl R. & Brune B. (2005) NO restores HIF-1alpha hydroxylation during hypoxia: role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 39, 925-936.
- Cameron H.A., McEwen B.S. & Gould E. (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci*, 15, 4687-4692.
- Cande C., Vahsen N., Kouranti I., Schmitt E., Daugas E., Spahr C., Luban J., Kroemer R.T., Giordanetto F., Garrido C., Penninger J.M. & Kroemer G. (2004) AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis. *Oncogene*, 23, 1514-1521.
- Carmeliet P., Moons L., Luttun A., Vincenti V., Compernelle V., De Mol M., Wu Y., Bono F., Devy L., Beck H., Scholz D., Acker T., DiPalma T., Dewerchin M., Noel A., Stalmans I., Barra A., Blacher S., Vandendriessche T., Ponten A., Eriksson U., Plate K.H., Foidart J.M., Schaper W., Charnock-Jones D.S., Hicklin D.J., Herbert J.M., Collen D. & Persico M.G. (2001) Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*, 7,575-583.

-B,C-

- Carmichael S.T., Archibeque I., Luke L., Nolan T., Momiy J. & Li S. (2005) Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Exp Neurol*, 193, 291-311.
- Carmichael S.T. (2006) Cellular and molecular mechanisms of neural repair after stroke: making waves. *Ann Neurol*, 59, 735-742.
- Celotto A.C., Capellini V.K., Baldo C.F., Dalio M.B., Rodrigues A.J. & Evora P.R. (2008) Effects of acid-base imbalance on vascular reactivity. *Braz J Med Biol Res*, 41, 439-445.
- Chamak B., Morandi V. & Mallat M. (1994) Brain macrophages stimulate neurite growth and regeneration by secreting thrombospondin. *J Neurosci Res*, 38,221-233.
- Chambon P., Weill J.D. & Mandel P. (1963) Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*, 11, 39-43.
- Chan P.H. (2001) Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 2-14.
- Chan W.Y., Kohsaka S. & Rezaie P. (2007) The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*, 53,344-354.
- Chang W.J. & Alvarez-Gonzalez R. (2001) The sequence-specific DNA binding of NF-kappa B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase 1. *J Biol Chem*, 276, 47664-47670.
- Chen H.H., Chien C.H. & Liu H.M. (1994) Correlation between angiogenesis and basic fibroblast growth factor expression in experimental brain infarct. *Stroke*, 25, 1651-1657.
- Chen J.J. & Yu B.P. (1994) Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med*, 17, 411-418.
- Chen Y., Hallenbeck J.M., Ruetzler C., Bol D., Thomas K., Berman N.E. & Vogel S.N. (2003) Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 748-755.
- Chen J., Zacharek A., Zhang C., Jiang H., Li Y., Roberts C., Lu M., Kapke A. & Chopp M. (2005) Endothelial nitric oxide synthase regulates brain-derived neurotrophic factor expression and neurogenesis after stroke in mice. *J Neurosci*, 25, 2366-2375.
- Chiarugi A. & Moskowitz M.A. (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity promotes NF-kappaB-driven transcription and microglial activation: implication for neurodegenerative disorders. *J Neurochem*, 85, 306-317.
- Cho I.J., Lee A.K., Lee S.J., Lee M.G. & Kim S.G. (2005) Repression by oxidative stress of iNOS and cytokine gene induction in macrophages results from AP-1 and NF-kappaB inhibition mediated by B cell translocation gene-1 activation. *Free Radic Biol Med*, 39, 1523-1536.
- Christopherson K.S., Ullian E.M., Stokes C.C., Mallowney C.E., Hell J.W., Agah A., Lawler J., Mosher D.F., Bornstein P. & Barres B.A. (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120, 421-433.
- Chua J.J., Kindler S., Boyken J. & Jahn R. (2010) The architecture of an excitatory synapse. *J Cell Sci*, 123, 819-823.
- Clark W.M., Rinker L.G., Lessov N.S., Hazel K., Hill J.K., Stenzel-Poore M. & Eckenstein F. (2000) Lack of interleukin-6 expression is not protective against focal central nervous system ischemia. *Stroke*, 31, 1715-1720.
- Cohen-Armon M. (2007) PARP-1 activation in the ERK signaling pathway. *Trends Pharmacol Sci*, 28, 556-560.
- Collin T., Arvidsson A., Kokaia Z. & Lindvall O. (2005) Quantitative analysis of the generation of different striatal neuronal subtypes in the adult brain following excitotoxic injury. *Exp Neurol*, 195, 71-80.
- Cooper-Kuhn C.M., Vroemen M., Brown J., Ye H., Thompson M.A., Winkler J. & Kuhn H.G. (2002) Impaired adult neurogenesis in mice lacking the transcription factor E2F1. *Mol Cell Neurosci*, 21, 312-323.

- Cosi C., Colpaert F., Koek W., Degryse A. & Marien M. (1996) Poly(ADP-ribose) Polymerase inhibitors protect against MPTP-induced depletions of striatal dopamine and cortical noradrenaline in C57B1/6 mice. *Brain Res*, 729,264-269.
- Couffinhal T., Dufourcq P., Daret D. & Duplaa C. (2001) [The mechanisms of angiogenesis. Medical and therapeutic applications]. *Rev Med Interne*, 22, 1064-1082.
- Couturier J.Y., Ding-Zhou L., Croci N., Plotkine M. & Margail I. (2003) 3-Aminobenzamide reduces brain infarction and neutrophil infiltration after transient focal cerebral ischemia in mice. *Exp Neurol*, 182, 973-980.
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I. & Poirier G.G. (1999) Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J*, 342 (Pt 2), 249-268.
- Dancause N., Barbay S., Frost S.B., Plautz E.J., Chen D., Zoubina E.V., Stowe A.M. & Nudo R.J. (2005) Extensive cortical rewiring after brain injury. *J Neurosci*, 25, 10167-10179.
- Davenport R.W. & McCaig C.D. (1993) Hippocampal growth cone responses to focally applied electric fields. *J Neurobiol*, 24, 89-100.
- Davies K.J. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem*, 262, 9895-9901.
- Davoust N., Vuailat C., Cavillon G., Domenget C., Hatterer E., Bernard A., Dumontel C., Jurdic P., Malcus C., Confavreux C., Belin M.F. & Nataf S. (2006) Bone marrow CD34+/B220+ progenitors target the inflamed brain and display in vitro differentiation potential toward microglia. *Faseb J*, 20, 2081-2092.
- Davoust N., Vuailat C., Androdias G. & Nataf S. (2008) From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol*, 29,227-234.
- Davy A. & Soriano P. (2005) Ephrin signaling in vivo: look both ways. *Dev Dyn*, 232, 1-10.
- de Murcia J.M., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F.J., Masson M., Dierich A., LeMeur M., Walztinger C., Chambon P. & de Murcia G. (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7303-7307.
- Deisseroth K., Singla S., Toda H., Monje M., Palmer T.D. & Malenka R.C. (2004) Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells. *Neuron*, 42, 535-552.
- del Zoppo G.J., Milner R., Mabuchi T., Hung S., Wang X., Berg G.I. & Koziol J.A. (2007) Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. *Stroke*, 38, 646-651.
- del Zoppo G.J. (2009) Relationship of neurovascular elements to neuron injury during ischemia. *Cerebrovasc Dis*, 27 Suppl 1,65-76.
- del Zoppo G.J. (2010) The neurovascular unit, matrix proteases, and innate inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 1207,46-49.
- Demougeot C., Bertrand N., Prigent-Tessier A., Garnier P., Mossiat C., Giroud M., Marie C. & Beley A. (2003) Reversible loss of N-acetyl-aspartate in rats subjected to long-term focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23,482-489.
- Demougeot C., Van Hoecke M., Bertrand N., Prigent-Tessier A., Mossiat C., Beley A. & Marie C. (2004) Cytoprotective efficacy and mechanisms of the liposoluble iron chelator 2,2'-dipyridyl in the rat photothrombotic ischemic stroke model. *J Pharmacol Exp Ther*, 311, 1080-1087.
- Denault J.B. & Salvesen G.S. (2008) Apoptotic caspase activation and activity. *Methods Mol Biol*, 414,191-220.
- Denes A., Vidyasagar R., Feng J., Narvainen J., McColl B.W., Kauppinen R.A. & Allan S.M. (2007) Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 1941-1953.
- Denes A., Ferenczi S., Halasz J., Kornyei Z. & Kovacs K.J. (2008) Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28,1707-1721.
- Di Filippo M., Sarchielli P., Picconi B. & Calabresi P. (2008) Neuroinflammation and synaptic plasticity: theoretical basis for a novel, immune-centred, therapeutic approach to neurological disorders. *Trends Pharmacol Sci*, 29, 402-412.
- Dickson B.J. (2002) Molecular mechanisms of axon guidance. *Science*, 298, 1959-1964.

-D-

- Dimitrijevic O.B., Stamatovic S.M., Keep R.F. & Andjelkovic A.V. (2007) Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke*, 38,1345-1353.
- Dirnagl U., Iadecola C. & Moskowitz M.A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22, 391-397.
- Djukic M., Mildner A., Schmidt H., Czesnik D., Bruck W., Priller J., Nau R. & Prinz M. (2006) Circulating monocytes engraft in the brain, differentiate into microglia and contribute to the pathology following meningitis in mice. *Brain*, 129,2394-2403.
- Duncan P.W., Jorgensen H.S. & Wade D.T. (2000) Outcome measures in acute stroke trials: a systematic review and some recommendations to improve practice. *Stroke*, 31, 1429-1438.
- Ekdahl C.T., Claasen J.H., Bonde S., Kokaia Z. & Lindvall O. (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13632-13637.
- Ekdahl C.T., Kokaia Z. & Lindvall O. (2009) Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience*, 158,1021-1029.
- Elkabes S., DiCicco-Bloom E.M. & Black I.B. (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci*, 16, 2508-2521
- Emerich D.F., Dean R.L. 3rd & Bartus R.T. (2002) The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Exp Neurol*, 173,168-181.
- Emmerich J. *Maladies des vaisseaux*. Paris : Doin, 1998.
- Emsley H.C. & Tyrrell P.J. (2002) Inflammation and infection in clinical stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22, 1399-1419.
- Eng L.F., Yu A.C. & Lee Y.L. (1992) Astrocytic response to injury. *Prog Brain Res*, 94,353-365.
- Estrada C. & Murillo-Carretero M. (2005) Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease. *Neuroscientist*, 11, 294-307.
- Fan T.J., Han L.H., Cong R.S. & Liang J. (2005) Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 37,719-727.
- Farber K., Pannasch U. & Kettenmann H. (2005) Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci*, 29,128-138.
- Fedoroff S., Zhai R. & Novak J.P. (1997) Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res*, 50, 477-486.
- Felger J.C., Abe T., Kaunzner U.W., Gottfried-Blackmore A., Gal-Toth J., McEwen B.S., Iadecola C. & Bulloch K. (2010) Brain dendritic cells in ischemic stroke: time course, activation state, and origin. *Brain Behav Immun*, 24,724-737.
- Ferro A.M. & Oppenheimer N.J. (1978) Structure of a poly (adenosine diphosphoribose) monomer: 2'-(5"-hosphoribosyl)-5'-adenosine monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 809-813.
- Flowers F. & Zimmerman J.J. (1998) Reactive oxygen species in the cellular pathophysiology of shock. *New Horiz*, 6, 169-180.
- Ford A.L., Goodsall A.L., Hickey W.F. & Sedgwick J.D. (1995) Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol*, 154,4309-4321.
- Franken S., Junghans U., Rosslenbroich V., Baader S.L., Hoffmann R., Gieselmann V., Viebahn C. & Kappler J. (2003) Collapsin response mediator proteins of neonatal rat brain interact with chondroitin sulfate. *J Biol Chem*, 278, 3241-3250.
- Frelin C., Vigne P., Ladoux A. & Lazdunski M. (1988) The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. *Eur J Biochem*, 174, 3-14.
- Frost S.B., Barbay S., Friel K.M., Plautz E.J. & Nudo R.J. (2003) Reorganization of remote cortical regions after ischemic brain injury: a potential substrate for stroke recovery. *J Neurophysiol*, 89, 3205-3214.
- Fujita S., Tsuchihashi Y. & Kitamura T. (1981) Origin, morphology and function of the microglia. *Prog Clin Biol Res*, 59A,141-169.
- Gaillard S., Nasarre C., Gonthier B. & Bagnard D. (2005) [The cellular and molecular basis of axonal growth]. *Rev Neurol (Paris)*. 161, 153-172.

- Galea E., Feinstein D.L. & Reis D.J. (1992) Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89,10945-10949.
- Garcia A.D., Doan N.B., Imura T., Bush T.G. & Sofroniew M.V. (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci*, 7, 1233-1241.
- Gibson R.M., Rothwell N.J. & Le Feuvre R.A. (2004) CNS injury: the role of the cytokine IL-1. *Vet J*, 168,230-237.
- Giulian D. & Baker T.J. (1986) Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J Neurosci*, 6,2163-2178.
- Gould E., McEwen B.S., Tanapat P., Galea L.A. & Fuchs E. (1997) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci*, 17, 2492-2498.
- Govek E.E., Newey S.E. & Van Aelst L. (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev*, 19, 1-49.
- Gradwohl G., Menissier de Murcia J.M., Molinete M., Simonin F., Koken M., Hoeijmakers J.H. & de Murcia G. (1990) The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 2990-2994.
- Graeber M.B. (2010) Changing face of microglia. *Science*, 330,783-788.
- Grome J.J., Gojowczyk G., Hofmann W. & Graham D.I. (1988) Quantitation of photochemically induced focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*, 8,89-95.
- Gupta S.K., Mishra R., Kusum S., Spedding M., Meiri K.F., Gressens P. & Mani S. (2009) GAP-43 is essential for the neurotrophic effects of BDNF and positive AMPA receptor modulator S18986. *Cell Death Differ*, 16,624-637.
- Hagberg H., Andersson P., Lacarewicz J., Jacobson I., Butcher S. & Sandberg M. (1987) Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem*, 49, 227-231.
- Hall A.C., Lucas F.R. & Salinas P.C. (2000) Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling. *Cell*, 100, 525-535.
- Hallenbeck J.M. (1996) Significance of the inflammatory response in brain ischemia. *Acta Neurochir Suppl*, 66, 27-31.
- Hallenbeck J.M. (2002) The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med*, 8, 1363-1368.
- Halliwell B. (1981) The biological effects of the superoxide radical and its products. *Bull Eur Physiopathol Respir*, 17 Suppl,21-29.
- Hao C., Richardson A. & Fedoroff S. (1991) Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: characterization and properties of the macrophage-like cells. *Int J Dev Neurosci*, 9,1-14.
- Haqqani A.S., Nestic M., Preston E., Baumann E., Kelly J. & Stanimirovic D. (2005) Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and ICAT-nanoLC-MS/MS. *Faseb J*, 19, 1809-1821.
- Haring H.P., Berg E.L., Tsurushita N., Tagaya M. & del Zoppo G.J. (1996) E-selectin appears in nonischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia. *Stroke*, 27,1386-1391; discussion 91-2.
- Hassa P.O., Covic M., Hasan S., Imhof R. & Hottiger M.O. (2001) The enzymatic and DNA binding activity of PARP-1 are not required for NF-kappa B coactivator function. *J Biol Chem*, 276, 45588-45597.
- Hassa P.O. & Hottiger M.O. (2002) The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci*, 59, 1534-1553.
- Hastings T.G. (1995) Enzymatic oxidation of dopamine: the role of prostaglandin H synthase. *J Neurochem*, 64, 919-924.
- Hata R., Maeda K., Hermann D., Mies G. & Hossmann K.A. (2000) Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20,937-946.
- Hayashi T., Noshita N., Sugawara T. & Chan P.H. (2003) Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 166-180.

-G,H-

- Heidemann S.R., Landers J.M. & Hamborg M.A. (1981) Polarity orientation of axonal microtubules. *J Cell Biol*, 91, 661-665.
- Hemnani T. & Parihar M.S. (1998) Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. *Indian J Physiol Pharmacol*, 42, 440-452.
- Herrmann O., Tarabin V., Suzuki S., Attigah N., Coserea I., Schneider A., Vogel J., Prinz S., Schwab S., Monyer H., Brombacher F. & Schwaninger M. (2003) Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 406-415.
- Hertz L. (2008) Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology*, 55, 289-309.
- Hilz H. (1981) ADP-ribosylation of proteins--a multifunctional process. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 362, 1415-1425.
- Hitoshi S., Alexson T., Tropepe V., Donoviel D., Elia A.J., Nye J.S., Conlon R.A., Mak T.W., Bernstein A. & van der Kooy D. (2002) Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev*, 16, 846-858.
- Hou S.T., Jiang S.X. & Smith R.A. (2008) Permissive and repulsive cues and signalling pathways of axonal outgrowth and regeneration. *Int Rev Cell Mol Biol*, 267, 125-181.
- Husemann J., Loike J.D., Anankov R., Febbraio M. & Silverstein S.C. (2002) Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia*, 40, 195-205.
- Hwang I.K., Yoo K.Y., Park S.K., An S.J., Lee J.Y., Choi S.Y., Kang J.H., Kwon Y.G., Kang T.C. & Won M.H. (2004) Expression and changes of endogenous insulin-like growth factor-1 in neurons and glia in the gerbil hippocampus and dentate gyrus after ischemic insult. *Neurochem Int*, 45, 149-156.
- Hyslop P.A., Zhang Z., Pearson D.V. & Phebus L.A. (1995) Measurement of striatal H₂O₂ by microdialysis following global forebrain ischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H₂O₂ in vitro. *Brain Res*, 671, 181-186.
- Iadecola C., Zhang F., Casey R., Nagayama M. & Ross M.E. (1997) Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci*, 17, 9157-9164.
- Ichtchenko K., Hata Y., Nguyen T., Ullrich B., Missler M., Moomaw C. & Sudhof T.C. (1995) Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins. *Cell*, 81, 435-443.
- Inoue K. (2002) Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia*, 40, 156-163.
- Isik N., Berkman M.Z., Pamir M.N., Kalelioglu M. & Sav A. (2005) Effect of allopurinol in focal cerebral ischemia in rats: an experimental study. *Surg Neurol*, 64 Suppl 2, S5-10.
- Ivana Scovassi A. & Diederich M. (2004) Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem Pharmacol*, 68, 1041-1047.
- Jagtap P. & Szabo C. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 421-440.
- Jahn R. & Scheller R.H. (2006) SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 631-643.
- Jamme I., Petit E., Divoux D., Gerbi A., Maixent J.M. & Nouvelot A. (1995) Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport*, 7, 333-337.
- Jenkins W.M., Merzenich M.M., Ochs M.T., Allard T. & Guic-Robles E. (1990) Functional reorganization of primary somatosensory cortex in adult owl monkeys after behaviorally controlled tactile stimulation. *J Neurophysiol*, 63, 82-104.
- Jian Liu K. & Rosenberg G.A. (2005) Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*, 39, 71-80.
- Jiang Y., Wei N., Lu T., Zhu J., Xu G. & Liu X. (2011) Intranasal brain-derived neurotrophic factor protects brain from ischemic insult via modulating local inflammation in rats. *Neuroscience*, 172, 398-405.
- Jin K., Graham S.H., Mao X., Nagayama T., Simon R.P. & Greenberg D.A. (2001) Fas (CD95) may mediate delayed cell death in hippocampal CA1 sector after global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 21, 1411-1421.

- Jin R., Yang G. & Li G. (2010) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*, 87, 779-789.
- Joseph D'Ercole A. & Ye P. (2008) Expanding the mind: insulin-like growth factor I and brain development. *Endocrinology*, 149,5958-5962.
- Jourdain P., Nikonenko I., Alberi S. & Muller D. (2002) Remodeling of hippocampal synaptic networks by a brief anoxia-hypoglycemia. *J Neurosci*, 22,3108-3116.
- Jung S.H., Lee S.T., Chu K., Park J.E., Lee S.U., Han T.R. & Kim M. (2009) Cell proliferation and synaptogenesis in the cerebellum after focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 1284,180-190.
- Kahle K.T., Simard J.M., Staley K.J., Nahed B.V., Jones P.S. & Sun D. (2009) Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda)*, 24, 257-265.
- Kaneko H., Nishiguchi K.M., Nakamura M., Kachi S. & Terasaki H. (2008) Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49,4162-4168.
- Kaplan J., O'Connor M., Hake P.W. & Zingarelli B. (2005) Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase ameliorate myocardial reperfusion injury by modulation of activator protein-1 and neutrophil infiltration. *Shock*, 23, 233-238.
- Katoh-Semba R., Asano T., Ueda H., Morishita R., Takeuchi I.K., Inaguma Y. & Kato K. (2002) Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *Faseb J*, 16, 1328-1330.
- Katsuki H. & Okuda S. (1995) Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. *Prog Neurobiol*, 46, 607-636.
- Katsura K., Kristian T. & Siesjo B.K. (1994) Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans*, 22, 991-996.
- Kauppinen T.M. & Swanson R.A. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 promotes microglial activation, proliferation, and matrix metalloproteinase-9-mediated neuron death. *J Immunol*, 174, 2288-2296.
- Kauppinen T.M., Chan W.Y., Suh S.W., Wiggins A.K., Huang E.J. & Swanson R.A. (2006) Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7136-7141.
- Kaur C., Hao A.J., Wu C.H. & Ling E.A. (2001) Origin of microglia. *Microsc Res Tech*, 54, 2-9.
- Kelly M.A., Shuaib A. & Todd K.G. (2006) Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Exp Neurol*, 200, 38-49.
- Kempermann G., Jessberger S., Steiner B. & Kronenberg G. (2004) Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 27, 447-452.
- Kershman J. (1939) Genesis of microglia in the human brain. *Arch Neurol Psychiatr* 41, 24-50.
- Kim E. & Sheng M. (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci*, 5, 771-781.
- Kim S., Burette A., Chung H.S., Kwon S.K., Woo J., Lee H.W., Kim K., Kim H., Weinberg R.J. & Kim E. (2006) NGL family PSD-95-interacting adhesion molecules regulate excitatory synapse formation. *Nat Neurosci*, 9, 1294-1301.
- Kiningham K.K., Xu Y., Daosukho C., Popova B. & St Clair D.K. (2001) Nuclear factor kappaB-dependent mechanisms coordinate the synergistic effect of PMA and cytokines on the induction of superoxide dismutase 2. *Biochem J*, 353,147-156.
- Kintner D.B., Anderson M.K., Fitzpatrick J.H. Jr., Sailor K.A. & Gilboe D.D. (2000) 31P-MRS-based determination of brain intracellular and interstitial pH: its application to in vivo H+ compartmentation and cellular regulation during hypoxic/ischemic conditions. *Neurochem Res*, 25, 1385-1396.
- Kinuta Y., Kimura M., Itokawa Y., Ishikawa M. & Kikuchi H. (1989) Changes in xanthine oxidase in ischemic rat brain. *J Neurosurg*, 71, 417-420.
- Kirino T. (1982) Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res*, 239, 57-69.
- Kitamura T., Miyake T. & Fujita S. (1984) Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J Comp Neurol*, 226,421-433.
- Klatzo I. (1985) Brain oedema following brain ischaemia and the influence of therapy. *Br J Anaesth*, 57, 18-22.

-J,K-

- Klein J.A., Longo-Guess C.M., Rossmann M.P., Seburn K.L., Hurd R.E., Frankel W.N., Bronson R.T. & Ackerman S.L. (2002) The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*, 419, 367-374.
- Knieling M., Metz G.A., Antonow-Schlorke I. & Witte O.W. (2009) Enriched environment promotes efficiency of compensatory movements after cerebral ischemia in rats. *Neuroscience*, 163,759-769.
- Kobayashi Y. (2006) Neutrophil infiltration and chemokines. *Crit Rev Immunol*, 26,307-16.
- Koh D.W., Dawson T.M. & Dawson V.L. (2005) Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol Res*, 52, 5-14.
- Kohgo Y., Ikuta K., Ohtake T., Torimoto Y. & Kato J. (2008) Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol*, 88,7-15.
- Koike M., Shibata M., Tadakoshi M., Gotoh K., Komatsu M., Waguri S., Kawahara N., Kuida K., Nagata S., Kominami E., Tanaka K. & Uchiyama Y. (2008) Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol*, 172, 454-469.
- Komitova M., Perfilieva E., Mattsson B., Eriksson P.S. & Johansson B.B. (2006) Enriched environment after focal cortical ischemia enhances the generation of astroglia and NG2 positive polydendrocytes in adult rat neocortex. *Exp Neurol*, 199, 113-121.
- Kovacs Z., Ikezaki K., Samoto K., Inamura T. & Fukui M. (1996) VEGF andflt. Expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke*, 27, 1865-1872; discussion 1872-1863.
- Kovalenko T., Osadchenko I., Nikonenko A., Lushnikova I., Voronin K., Nikonenko I., Muller D. & Skibo G. (2006) Ischemia-induced modifications in hippocampal CA1 stratum radiatum excitatory synapses. *Hippocampus*, 16,814-825.
- Kraus W.L. & Lis J.T. (2003) PARP goes transcription. *Cell*, 113, 677-683.
- Kraus W.L. (2008) Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 294-302.
- Kreutzberg G.W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19,312-318.
- Krishnakumar R., Gamble M.J., Frizzell K.M., Berrocal J.G., Kininis M. & Kraus W.L. (2008) Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes. *Science*, 319, 819-821.
- Kristian T. & Siesjo B.K. (1998) Calcium in ischemic cell death. *Stroke*, 29, 705-718.
- Kristian T. (2004) Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. *Cell Calcium*, 36, 221-233.
- Kriz J. (2006) Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Crit Rev Neurobiol*, 18,145-157.
- Kriz J. & Lalancette-Hebert M. (2009) Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol*, 117, 497-509.
- Krupinski J., Kaluza J., Kumar P., Kumar S. & Wang J.M. (1994) Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke*, 25, 1794-1798.
- Kuhn T.B., Schmidt M.F. & Kater S.B. (1995) Laminin and fibronectin guideposts signal sustained but opposite effects to passing growth cones. *Neuron*, 14, 275-285.
- Kun E., Kirsten E., Mendeleyev J. & Ordahl C.P. (2004) Regulation of the enzymatic catalysis of poly(ADP-ribose) polymerase by dsDNA, polyamines, Mg²⁺, Ca²⁺, histones H1 and H3, and ATP. *Biochemistry*, 43, 210-216.
- Ladeby R., Wrenfeldt M., Garcia-Ovejero D., Fenger C., Dissing-Olesen L., Dalmau I. & Finsen B. (2005) Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*, 48, 196-206.
- Lai A.Y. & Todd K.G. (2006) Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. *Can J Physiol Pharmacol*, 84, 49-59.
- Lakhan S.E., Kirchgessner A. & Hofer M. (2009) Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med*, 7,97.
- Lalancette-Hebert M., Gowing G., Simard A., Weng Y.C. & Kriz J. (2007) Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci*, 27,2596-605.

- Langelier M.F., Servent K.M., Rogers E.E. & Pascal J.M. (2008) A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation. *J Biol Chem*, 283, 4105-4114.
- Lassmann H., Schmied M., Vass K. & Hickey W.F. (1993) Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia*, 7,19-24.
- Lawson L.J., Matyszak M.K. & Perry V.H. (1993) Lessons from microglia in special sites. *Clin Neuropathol*, 12,310-313.
- Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G. & Earnshaw W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, 371, 346-347.
- Lee V.M., Burdett N.G., Carpenter A., Hall L.D., Pambakian P.S., Patel S., Wood N.I. & James M.F. (1996) Evolution of photochemically induced focal cerebral ischemia in the rat. Magnetic resonance imaging and histology. *Stroke*, 27,2110-2119.
- Lee J.I. & Burckart G.J. (1998) Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target. *J Clin Pharmacol*, 38,981-993.
- Lee T.H., Kato H., Chen S.T., Kogure K. & Itoyama Y. (2002) Expression disparity of brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity and mRNA in ischemic hippocampal neurons. *Neuroreport*, 13, 2271-2275.
- Lewen A., Matz P. & Chan P.H. (2000) Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma*, 17, 871-890.
- Ley K., Laudanna C., Cybulsky M.I. & Nourshargh S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7,678-689.
- Lichtenwalner R.J. & Parent J.M. (2006) Adult neurogenesis and the ischemic forebrain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26, 1-20.
- Lie D.C., Song H., Colamarino S.A., Ming G.L. & Gage F.H. (2004) Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 399-421.
- Liepert J., Storch P., Fritsch A. & Weiller C. (2000) Motor cortex disinhibition in acute stroke. *Clin Neurophysiol*, 111, 671-676.
- Liesz A., Suri-Payer E., Veltkamp C., Doerr H., Sommer C., Rivest S., Giese T. & Veltkamp R. (2009) Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med*, 15, 192-199.
- Lin P., Polverini P., Dewhirst M., Shan S., Rao P.S. & Peters K. (1997) Inhibition of tumor angiogenesis using a soluble receptor establishes a role for Tie2 in pathologic vascular growth. *J Clin Invest*, 100, 2072-2078.
- Ling E.A. & Wong W.C. (1993) The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia*, 7,9-18.
- Linnik M.D., Zobrist R.H. & Hatfield M.D. (1993) Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 24, 2002-2009.
- Lipton P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev*, 79, 1431-1568.
- Liu H., Colavitti R., Rovira II & Finkel T. (2005a) Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res*, 97, 967-974.
- Liu X., Wang Q., Haydar T.F. & Bordey A. (2005b) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci*, 8,1179-1187.
- Lledo P.M., Alonso M. & Grubb M.S. (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*, 7, 179-193.
- Lopez-Neblina F., Toledo A.H. & Toledo-Pereyra L.H. (2005) Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg*, 18,335-350.
- Lowry O.H., Passonneau J.V., Hasselberger F.X. & Schulz D.W. (1964) Effect of Ischemia on Known Substrates and Cofactors of the Glycolytic Pathway in Brain. *J Biol Chem*, 239, 18-30.
- Lynch M.A. (2009) The multifaceted profile of activated microglia. *Mol Neurobiol*, 40,139-156.
- MacKenzie E.L., Iwasaki K. & Tsuji Y. (2008) Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*, 10,997-1030.
- Mahagne M.H. (2008) La thrombolyse de l'infarctus cerebral aigu en 2008 : état des lieux et perspectives. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 20, 527-533.

-L,M-

- Maker H.S., Weiss C., Silides D.J. & Cohen G. (1981) Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J Neurochem*, 36, 589-593.
- Marchetti B. & Abbracchio M.P. (2005) To be or not to be (inflamed)--is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Pharmacol Sci*, 26,517-525.
- Margaill I., Plotkine M. & Lerouet D. (2005) Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med*, 39, 429-443.
- Margeta M.A. & Shen K. (2010) Molecular mechanisms of synaptic specificity. *Mol Cell Neurosci*, 43,261-267.
- Marin-Teva J.L., Dusart I., Colin C., Gervais A., van Rooijen N. & Mallat M. (2004) Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron*, 41, 535-547.
- Martin-Oliva D., Aguilar-Quesada R., O'Valle F., Munoz-Gamez J.A., Martinez-Romero R., Garcia Del Moral R., Ruiz de Almodovar J.M., Villuendas R., Piris M.A. & Oliver F.J. (2006) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modulates tumor-related gene expression, including hypoxia-inducible factor-1 activation, during skin carcinogenesis. *Cancer research*, 66, 5744-5756.
- Massague J., Cheifetz S., Boyd F.T. & Andres J.L. (1990) TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann N Y Acad Sci*, 593, 59-72.
- Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J. & de Murcia G. (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol*, 18, 3563-3571.
- Masuda T., Sakuma C. & Yaginuma H. (2009) Role for netrin-1 in sensory axonal guidance in higher vertebrates. *Fukushima J Med Sci*, 55,1-6.
- Matsumoto Y. & Fujiwara M. (1987) Absence of donor-type major histocompatibility complex class I antigen-bearing microglia in the rat central nervous system of radiation bone marrow chimeras. *J Neuroimmunol*, 17,71-82.
- Matsunaga E. & Chedotal A. (2004) Repulsive guidance molecule/neogenin: a novel ligand-receptor system playing multiple roles in neural development. *Dev Growth Differ*, 46, 481-486.
- McEver R.P. (2002) Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol*, 14,581-586.
- McEwen B.S. (1996) Gonadal and adrenal steroids regulate neurochemical and structural plasticity of the hippocampus via cellular mechanisms involving NMDA receptors. *Cell Mol Neurobiol*, 16,103-116.
- McNeill H., Williams C., Guan J., Dragunow M., Lawlor P., Sirimanne E., Nikolics K. & Gluckman P. (1994) Neuronal rescue with transforming growth factor-beta 1 after hypoxic-ischaemic brain injury. *Neuroreport*, 5, 901-904.
- Mehta S.L., Manhas N. & Raghurir R. (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev*, 54, 34-66.
- Mendoza-Alvarez H. & Alvarez-Gonzalez R. (1993) Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular. *J Biol Chem*, 268, 22575-22580.
- Mergenthaler P., Dirnagl U. & Meisel A. (2004) Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis*, 19, 151-167.
- Mildner A., Schmidt H., Nitsche M., Merkler D., Hanisch U.K., Mack M., Heikenwalder M., Bruck W., Priller J. & Prinz M. (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat Neurosci*, 10,1544-1553.
- Milligan C.E., Levitt P. & Cunningham T.J. (1991) Brain macrophages and microglia respond differently to lesions of the developing and adult visual system. *J Comp Neurol*, 314,136-146.
- Minc-Golomb D., Yadid G., Tsarfaty I., Resau J.H. & Schwartz J.P. (1996) In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in cerebellar neurons. *J Neurochem*, 66,1504-1509.
- Miramar M.D., Costantini P., Ravagnan L., Saraiva L.M., Haouzi D., Brothers G., Penninger J.M., Peleato M.L., Kroemer G. & Susin S.A. (2001) NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem*, 276, 16391-16398.

- Mizukoshi S., Nakazawa M., Sato K., Ozaki T., Metoki T. & Ishiguro S. (2010) Activation of mitochondrial calpain and release of apoptosis-inducing factor from mitochondria in RCS rat retinal degeneration. *Exp Eye Res*, 91,353-361.
- Monier A., Adle-Biassette H., Delezoide A.L., Evrard P., Gressens P. & Verney C. (2007) Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*, 66,372-382.
- Moon J.B., Lee C.H., Park C.W., Cho J.H., Hwang I.K., Yoo K.Y., Choi J.H., Shin H.C. & Won M.H. (2009) Neuronal degeneration and microglial activation in the ischemic dentate gyrus of the gerbil. *J Vet Med Sci*, 71, 1381-1386.
- Morfini G., Szebenyi G., Brown H., Pant H.C., Pigino G., DeBoer S., Beffert U. & Brady S.T. (2004) A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *Embo J*, 23, 2235-2245.
- Morioka T., Kalehua A.N. & Streit W.J. (1991) The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 11, 966-973.
- Morioka T., Kalehua A.N. & Streit W.J. (1993) Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Comp Neurol*, 327, 123-132.
- Morita A., Yamashita N., Sasaki Y., Uchida Y., Nakajima O., Nakamura F., Yagi T., Taniguchi M., Usui H., Katoh-Semba R., Takei K. & Goshima Y. (2006) Regulation of dendritic branching and spine maturation by semaphorin3A-Fyn signaling. *J Neurosci*, 26, 2971-2980.
- Moroni F. (2008) Poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP-1) and postischemic brain damage. *Curr Opin Pharmacol*, 8, 96-103.
- Mosevitsky M.I. (2005) Nerve ending "signal" proteins GAP-43, MARCKS, and BASP1. *Int Rev Cytol*, 245, 245-325.
- Mukhopadhyay S. & Gordon S. (2004) The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity. *Immunobiology*, 209, 39-49.
- Muller W.A., Weigl S.A., Deng X. & Phillips D.M. (1993) PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*, 178,449-460.
- Murphy T.H. & Corbett D. (2009) Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci*, 10, 861-872. -M,N-
- Myers K.A., Tint I., Nadar C.V., He Y., Black M.M. & Baas P.W. (2006) Antagonistic forces generated by cytoplasmic dynein and myosin-II during growth cone turning and axonal retraction. *Traffic*, 7,1333-1351.
- Nakajima K., Honda S., Tohyama Y., Imai Y., Kohsaka S. & Kurihara T. (2001) Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res*, 65, 322-331.
- Nakajima K., Tohyama Y., Maeda S., Kohsaka S. & Kurihara T. (2007) Neuronal regulation by which microglia enhance the production of neurotrophic factors for GABAergic, catecholaminergic, and cholinergic neurons. *Neurochem Int*, 50, 807-820.
- Nakajima H., Nagaso H., Kakui N., Ishikawa M., Hiranuma T. & Hoshiko S. (2004) Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells. *J Biol Chem*, 279, 42774-42786.
- Nakashima M.N., Yamashita K., Kataoka Y., Yamashita Y.S. & Niwa M. (1995) Time course of nitric oxide synthase activity in neuronal, glial, and endothelial cells of rat striatum following focal cerebral ischemia. *Cell Mol Neurobiol*, 15, 341-349.
- Nakata N., Kato H. & Kogure K. (1992) Protective effects of serotonin reuptake inhibitors, citalopram and clomipramine, against hippocampal CA1 neuronal damage following transient ischemia in the gerbil. *Brain Res*, 590, 48-52.
- Nakayama H., Jorgensen H.S., Raaschou H.O. & Olsen T.S. (1994) Recovery of upper extremity function in stroke patients: the Copenhagen Stroke Study. *Arch Phys Med Rehabil*, 75, 394-398.
- Nakazawa H., Genka C. & Fujishima M. (1996) Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol*, 46, 15-32.
- Narantuya D., Nagai A., Sheikh A.M., Masuda J., Kobayashi S., Yamaguchi S. & Kim S.U. (2010) Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement. *PLoS One*, 5,e11746.

- Niizuma K., Yoshioka H., Chen H., Kim G.S., Jung J.E., Katsu M., Okami N. & Chan P.H. (2010) Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta*, 1802,92-99.
- Nimmerjahn A., Kirchhoff F. & Helmchen F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308,1314-8.
- Nogawa S., Zhang F., Ross M.E. & Iadecola C. (1997) Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *J Neurosci*, 17, 2746-2755.
- Norris D.G., Niendorf T. & Leibfritz D. (1994) Health and infarcted brain tissues studied at short diffusion times: the origins of apparent restriction and the reduction in apparent diffusion coefficient. *NMR Biomed*, 7,304-310.
- Nudo R.J. (2006) Plasticity. *NeuroRx*, 3,420-427.
- O'Donnell S.L., Frederick T.J., Krady J.K., Vannucci S.J. & Wood T.L. (2002) IGF-I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain. *Glia*, 39, 85-97.
- Ogino H., Nozaki T., Gunji A., Maeda M., Suzuki H., Ohta T., Murakami Y., Nakagama H., Sugimura T. & Masutani M. (2007) Loss of Parp-1 affects gene expression profile in a genome-wide manner in ES cells and liver cells. *BMC Genomics*, 8, 41.
- Ogura T., Takenouchi N., Yamaguchi M., Matsukage A., Sugimura T. & Esumi H. (1990) Striking similarity of the distribution patterns of the poly(ADP-ribose) polymerase and DNA polymerase beta among various mouse organs. *Biochem Biophys Res Commun*, 172, 377-384.
- Okada Y., Copeland B.R., Mori E., Tung M.M., Thomas W.S. & del Zoppo G.J. (1994) P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke*, 25,202-211.
- Oliver F.J., Menissier-de Murcia J., Nacci C., Decker P., Andriantsitohaina R., Muller S., de la Rubia G., Stoclet J.C. & de Murcia, G. (1999) Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice. *Embo J*, 18, 4446-4454.
- Olson J.K., Girvin A.M. & Miller S.D. (2001) Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. *J Virol*, 75, 9780-9789.
- Oubidar M., Boquillon M., Marie C., Schreiber L. & Bralet J. (1994) Ischemia-induced brain iron delocalization: effect of iron chelators. *Free Radic Biol Med*, 16, 861-867.
- Pang L., Ye W., Che X.M., Roessler B.J., Betz A.L. & Yang G.Y. (2001) Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral-mediated transforming growth factor-ss1 expression. *Stroke*, 32, 544-552.
- Panickar K.S. & Norenberg M.D. (2005) Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia*, 50, 287-298.
- Parmentier S., Bohme G.A., Lerouet D., Damour D., Stutzmann J.M., Margail I. & Plotkine M.(1999) Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury. *Br J Pharmacol*, 127,546-552.
- Pasare C. & Medzhitov R. (2004) Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol*, 16, 23-26.
- Pascual-Leone A., Amedi A., Fregni F. & Merabet L.B. (2005) The plastic human brain cortex. *Annu Rev Neurosci*, 28, 377-401.
- Paterson J.A., Privat A., Ling E.A. & Leblond C.P. (1973) Investigation of glial cells in semithin sections. 3. Transformation of subependymal cells into glial cells, as shown by radioautography after 3 H-thymidine injection into the lateral ventricle of the brain of young rats. *J Comp Neurol*, 149, 83-102.
- Pecho-Vrieseling E., Sigrist M., Yoshida Y., Jessell T.M. & Arber S. (2009) Specificity of sensory-motor connections encoded by Sema3e-Plxnd1 recognition. *Nature*, 459, 842-846.
- Pedersen P.M., Jorgensen H.S., Nakayama H., Raaschou H.O. & Olsen T.S. (1995) Aphasia in acute stroke: incidence, determinants, and recovery. *Ann Neurol*, 38, 659-666.
- Pekny M. & Pekna M. (2004) Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol*, 204, 428-437.
- Pennell N.A. & Streit W.J. (1997) Colonization of neural allografts by host microglial cells: relationship to graft neovascularization. *Cell Transplant*, 6, 221-230.

- Perego C., Gatti S., Vetrugno G.C., Marzatico F. & Algeri S. (1992) Correlation between electroencephalogram isoelectric time and hippocampal norepinephrine levels, measured by microdialysis, during ischemia in rats. *J Neurochem*, 59,1257-1262.
- Petrak L.J., Harris K.M. & Kirov S.A. (2005) Synaptogenesis on mature hippocampal dendrites occurs via filopodia and immature spines during blocked synaptic transmission. *J Comp Neurol*. 484, 183-190.
- Petreanu L. & Alvarez-Buylla A. (2002) Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *J Neurosci*, 22, 6106-6113.
- Petrilli V., Herceg Z., Hassa P.O., Patel N.S., Di Paola R., Cortes U., Dugo L., Filipe H.M., Thiemermann C., Hottiger M.O., Cuzzocrea S. & Wang Z.Q. (2004) Noncleavable poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the inflammation response in mice. *J Clin Invest*, 114, 1072-1081.
- Petsko G.A. & Ringe D. *Structure et fonction des proteines*. Bruxelles : De Boek Université, 2008
- Pfefferkorn T. & Rosenberg G.A. (2003) Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke*, 34, 2025-2030.
- Pieper A.A., Blackshaw S., Clements E.E., Brat D.J., Krug D.K., White A.J., Pinto- Garcia P., Favit A., Conover J.R., Snyder S.H. & Verma A. (2000) Poly(ADP-ribose)ylation basally activated by DNA strand breaks reflects glutamate-nitric oxide neurotransmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 1845-1850.
- Planas A.M., Soriano M.A., Rodriguez-Farre E. & Ferrer I. (1995) Induction of cyclooxygenase-2 mRNA and protein following transient focal ischemia in the rat brain. *Neurosci Lett*, 200, 187-190.
- Planas A.M., Gorina R. & Chamorro A. (2006) Signalling pathways mediating inflammatory responses in brain ischaemia. *Biochem Soc Trans*, 34,1267-1270.
- Polazzi E. & Monti B. (2010) Microglia and neuroprotection: from in vitro studies to therapeutic applications. *Prog Neurobiol*, 92,293-315.
- Pollard J.W. (2009) Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*, 9,259-270.
- Prieto R., Carceller F., Roda J.M. & Avendano C. (2005) The intraluminal thread model revisited: rat strain differences in local cerebral blood flow. *Neurol Res*, 27, 47-52.
- Priller J., Flugel A., Wehner T., Boentert M., Haas C.A., Prinz M., Fernandez-Klett F., Prass K., Bechmann I., de Boer B.A., Frotscher M., Kreutzberg G.W., Persons D.A. & Dirnagl U. (2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med*, 7, 1356-1361.
- Pulsinelli W.A., Brierley J.B. & Plum F. (1982) Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia. *Ann Neurol*, 11, 491-498.
- Puyal J., Ginet V., Vaslin A., Truttmann A.C. & Clarke P.G. (2009) [The two faces of autophagy in the nervous system]. *Med Sci (Paris)*, 25,383-390.
- Rabchevsky A.G. & Streit W.J. (1997) Grafting of cultured microglial cells into the lesioned spinal cord of adult rats enhances neurite outgrowth. *J Neurosci Res*, 47, 34-48.
- Radomski M.W., Palmer R.M. & Moncada S. (1987) Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet*, 2, 1057-1058.
- Raivich G., Bohatschek M., Kloss C.U., Werner A., Jones L.L. & Kreutzberg G.W. (1999) Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev*, 30,77-105.
- Ransohoff R.M. & Perry V.H. (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, 27,119-45.
- Reale A., Matteis G.D., Galleazzi G., Zampieri M. & Caiafa P. (2005) Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers. *Oncogene*, 24, 13-19.
- Renner O., Tsimpas A., Kostin S., Valable S., Petit E., Schaper W. & Marti H.H. (2003) Time- and cell type-specific induction of platelet-derived growth factor receptor-beta during cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res*, 113, 44-51.
- Ribotta M.G., Menet V. & Privat A. (2004) Glial scar and axonal regeneration in the CNS: lessons from GFAP and vimentin transgenic mice. *Acta Neurochir Suppl*, 89,87-92.

-P,Q,R-

- Richardson A., Hao C. & Fedoroff S. (1993) Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia*, 7,25-33.
- Riederer B.M. (2007) Microtubule-associated protein 1B, a growth-associated and phosphorylated scaffold protein. *Brain Res Bull*, 71, 541-558.
- Riquelme P.T., Burzio L.O. & Koide S.S. (1979) ADP ribosylation of rat liver lysine-rich histone in vitro. *J Biol Chem*, 254, 3018-3028.
- Rock R.B., Gekker G., Hu S., Sheng W.S., Cheeran M., Lokensgard J.R. & Peterson P.K. (2004) Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev*, 17, 942-964.
- Rotshenker S. (2003) Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease. *J Mol Neurosci*, 21,65-72.
- Roumier A., Bechade C., Poncer J.C., Smalla K.H., Tomasello E., Vivier E., Gundelfinger E.D., Triller A. & Bessis A. (2004) Impaired synaptic function in the microglial KARAP/DAP12-deficient mouse. *J Neurosci*, 24,11421-11428.
- Ruf A., Mennissier de Murcia J., de Murcia G. & Schulz G.E. (1996) Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 7481-7485.
- Rupalla K., Allegrini P.R., Sauer D. & Wiessner C. (1998) Time course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathol*, 96, 172-178.
- Rydberg E. (1932) Cerebral injury in newborn children consequent on birth trauma, with an inquiry into the normal and pathological anatomy of the neuroglia. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 10, 1-247.
- Sairanen T.R., Lindsberg P.J., Brenner M. & Siren A.L. (1997) Global forebrain ischemia results in differential cellular expression of interleukin-1beta (IL-1beta) and its receptor at mRNA and protein level. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17, 1107-1120.
- Salinas P.C. & Zou Y. (2008) Wnt signaling in neural circuit assembly. *Annu Rev Neurosci*, 31,339-358.
- Sandvig A., Berry M., Barrett L.B., Butt A. & Logan A. (2004) Myelin-, reactive glia-, and scar-derived CNS axon growth inhibitors: expression, receptor signaling, and correlation with axon regeneration. *Glia*, 46, 225-251.
- Saucier D.M., Yager J.Y. & Armstrong E.A. (2010) Housing environment and sex affect behavioral recovery from ischemic brain damage. *Behav Brain Res*, 214,48-54.
- Schilling M., Besselmann M., Leonhard C., Mueller M., Ringelstein E.B. & Kiefer R. (2003) Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*, 183, 25-33.
- Schilling M., Besselmann M., Muller M., Strecker J.K., Ringelstein E.B. & Kiefer R. (2005) Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*, 196, 290-297.
- Schlaug G., Jancke L., Huang Y., Staiger J.F. & Steinmetz H. (1995) Increased corpus callosum size in musicians. *Neuropsychologia*, 33, 1047-1055.
- Schlue W.R. & Dorner R. (1992) The regulation of pH in the central nervous system. *Can J Physiol Pharmacol*, 70 Suppl, S278-285.
- Schmid C.D., Melchior B., Masek K., Puntambekar S.S., Danielson P.E., Lo D.D., Sutcliffe J.G. & Carson M.J. (2009) Differential gene expression in LPS/IFNgamma activated microglia and macrophages: in vitro versus in vivo. *J Neurochem*, 109 Suppl 1,117-125.
- Schreck R., Rieber P. & Baeuerle P.A. (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *Embo J*, 10, 2247-2258.
- Schreiber V., Hunting D., Trucco C., Gowans B., Grunwald D., De Murcia G. & De Murcia J.M. (1995) A dominant-negative mutant of human poly(ADP-ribose) polymerase affects cell recovery, apoptosis, and sister chromatid exchange following DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 4753-4757.

- Schroeter M., Jander S., Huitinga I., Witte O.W. & Stoll G. (1997) Phagocytic response in photochemically induced infarction of rat cerebral cortex. The role of resident microglia. *Stroke*, 28, 382-386.
- Schwartz M., Butovsky O., Bruck W. & Hanisch U.K. (2006) Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci*, 29,68-74.
- Schwartz-Bloom R.D. & Sah R. (2001) gamma-Aminobutyric acid(A) neurotransmission and cerebral ischemia. *J Neurochem*, 77,353-371.
- Selim M.H. & Ratan R.R. (2004) The role of iron neurotoxicity in ischemic stroke. *Ageing Res Rev*, 3,345-353.
- Shall S. & de Murcia G. (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res*, 460, 1-15.
- Shapiro L., Love J. & Colman D.R. (2007) Adhesion molecules in the nervous system: structural insights into function and diversity. *Annu Rev Neurosci*, 30, 451-474.
- Shen Q., Goderie S.K., Jin L., Karanth N., Sun Y., Abramova N., Vincent P., Pumiglia K. & Temple S. (2004) Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science*, 304, 1338-1340.
- Shimizu S., Kanaseki T., Mizushima N., Mizuta T., Arakawa-Kobayashi S., Thompson C.B. & Tsujimoto Y. (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*, 6,1221-1228.
- Sierra A., Encinas J.M., Deudero J.J., Chancey J.H., Enikolopv G., Overstreet-Wadiche L.S., Tsirka S.E. & Maletic-Savatic M. (2010) Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7, 483-495.
- Siesjo B.K. (1981) Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1, 155-185.
- Siesjo B.K. (1992) Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg*, 77, 337-354.
- Siesjo B.K. & Katsura K. (1992) Ischemic brain damage: focus on lipids and lipid mediators. *Adv Exp Med Biol*, 318, 41-56.
- Siesjo B.K., Zhao Q., Pahlmark K., Siesjo P., Katsura K. & Folbergrova J. (1995) Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *Ann Thorac Surg*, 59, 1316-1320.
- Simard A.R. & Rivest S. (2004) Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *Faseb J*, 18,998-1000.
- Simard A.R., Soulet D., Gowing G., Julien J.P. & Rivest S. (2006a) Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*, 49,489-502.
- Simard J.M., Chen M., Tarasov K.V., Bhatta S., Ivanova S., Melnitchenko L., Tsymbalyuk N., West G.A. & Gerzanich V. (2006b) Newly expressed SUR1-regulated NC(Ca-ATP) channel mediates cerebral edema after ischemic stroke. *Nat Med*, 12,433-440.
- Simard J.M., Kent T.A., Chen M., Tarasov K.V. & Gerzanich V. (2007) Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol*, 6,258-268.
- Smith C.J., Emsley H.C., Gavin C.M., Georgiou R.F., Vail A., Barberan E.M., del Zoppo G.J., Hallenbeck J.M., Rothwell N.J., Hopkins S.J. & Tyrrell P.J. (2004) Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol*, 4, 2.
- Song S., Miller K.D. & Abbott L.F. (2000) Competitive Hebbian learning through spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Nat Neurosci*, 3, 919-926.
- Song H., Stevens C.F. & Gage F.H. (2002) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417, 39-44.
- Sorce S., Bonnefont J., Julien S., Marq-Lin N., Rodriguez I., Dubois-Dauphin M. & Krause K.H. (2010) Increased brain damage after ischaemic stroke in mice lacking the chemokine receptor CCR5. *Br J Pharmacol*, 160,311-321.
- Soriano S.G., Amaravadi L.S., Wang Y.F., Zhou H., Yu G.X., Tonra J.R., Fairchild-Huntress V., Fang Q., Dunmore J.H., Huszar D. & Pan Y. (2002) Mice deficient in fractalkine are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Neuroimmunol*, 125, 59-65.

-S-

- Spera P.A., Ellison J.A., Feuerstein G.Z. & Barone F.C. (1998) IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett*, 251,189-192.
- Stadtman E.R. & Oliver C.N. (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem*, 266, 2005-2008.
- Stetler-Stevenson W.G. (1999) Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest*, 103, 1237-1241.
- Stevens B., Allen N.J., Vazquez L.E., Howell G.R., Christopherson K.S., Nouri N., Micheva K.D., Mehalow A.K., Huberman A.D., Stafford B., Sher A., Litke A.M., Lambris J.D., Smith S.J., John S.W. & Barres B.A. (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*, 131, 1164-1178.
- Stoll G., Jander S. & Schroeter M. (1998) Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol*, 56, 149-171.
- Stoll G., Schroeter M., Jander S., Siebert H., Wollrath A., Kleinschnitz C. & Bruck W. (2004) Lesion-associated expression of transforming growth factor-beta-2 in the rat nervous system: evidence for down-regulating the phagocytic activity of microglia and macrophages. *Brain Pathol*, 14, 51-58.
- Strbian D., Karjalainen-Lindsberg M.L., Tatlisumak T. & Lindsberg P.J. (2006) Cerebral mast cells regulate early ischemic brain swelling and neutrophil accumulation. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26, 605-612.
- Strbian D., Kovanen P.T., Karjalainen-Lindsberg M.L., Tatlisumak T. & Lindsberg P.J. (2009) An emerging role of mast cells in cerebral ischemia and hemorrhage. *Ann Med*, 41,438-450.
- Streit W.J., Graeber M.B. & Kreutzberg G.W. (1989) Peripheral nerve lesion produces increased levels of major histocompatibility complex antigens in the central nervous system. *J Neuroimmunol*, 21,117-123.
- Streit W.J. & Sparks D.L. (1997) Activation of microglia in the brains of humans with heart disease and hypercholesterolemic rabbits. *J Mol Med*, 75,130-138.
- Streit W.J., Walter S.A. & Pennell N.A. (1999) Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*, 57,563-581.
- Streit W.J. (2006) Microglial senescence: does the brain's immune system have an expiration date? *Trends Neurosci*, 29, 506-510.
- Streit W.J. (2001) Microglia and macrophages in the developing CNS. *Neurotoxicology*, 22, 619-624.
- Streit W.J. & Xue Q.S. (2009) Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol*, 4,371-379.
- Stroemer R.P., Kent T.A. & Hulsebosch C.E. (1995) Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke*, 26, 2135-2144.
- Sudhof T.C. & Malenka R.C. (2008) Understanding synapses: past, present, and future. *Neuron*, 60, 469-476.
- Sugimoto K., Abe K., Lee T.H., Sakurai E., Yanai K., Kogure K., Itoyama Y. & Watanabe T. (1994) Histamine depletion in brain caused by treatment with (S)alpha-fluoromethylhistidine enhances ischemic damage of gerbil hippocampal CA2 neurons. *Brain Res*, 666,279-283.
- Sulz L. & Bacigalupo J. (2006) Role of nitric oxide during neurogenesis in the olfactory epithelium. *Biol Res*, 39,589-599.
- Sun G.B., Huang Z.H., Sun Y.G. & Yang W.Y. (2003a) Intervention with nitric oxide synthase inhibitors for traumatic shock in rats. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 23, 306-309.
- Sun Y., Jin K., Xie L., Childs J., Mao X.O., Logvinova A. & Greenberg D.A. (2003b) VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*, 111, 1843-1851.
- Sun Y., Jin K., Childs J.T., Xie L., Mao X.O. & Greenberg D.A. (2005) Neuronal nitric oxide synthase and ischemia-induced neurogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25, 485-492.
- Suri C., Jones P.F., Patan S., Bartunkova S., Maisonpierre P.C., Davis S., Sato T.N. & Yancopoulos G.D. (1996) Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87, 1171-1180.
- Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M. & Kroemer G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441-446.

- Suzuki K. & Ohsumi Y. (2010) Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS). *FEBS Lett*, 584,1280-1286.
- Swanson R.A., Ying W. & Kauppinen T.M. (2004) Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med*, 4, 193-205.
- Szydłowska K. & Tymianski M. (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium*, 47,122-129.
- Takatsuru Y., Fukumoto D., Yoshitomo M., Nemoto T., Tsukada H. & Nabekura J. (2009) Neuronal circuit remodeling in the contralateral cortical hemisphere during functional recovery from cerebral infarction. *J Neurosci*, 29,10081-10086.
- Tambuyzer B.R., Ponsaerts P. & Nouwen E.J. (2009) Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukoc Biol*, 85,352-370.
- Tanida I. (2011) Autophagy basics. *Microbiol Immunol*, 55,1-11.
- Tao Z., Gao P., Hoffman D.W. & Liu H.W. (2008) Domain C of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 is important for enzyme activity and contains a novel zinc-ribbon motif. *Biochemistry*, 47, 5804-5813.
- Tarozzo G., Campanella M., Ghiani M., Bulfone A. & Beltramo M. (2002) Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in response to ischaemia-reperfusion brain injury in the rat. *Eur J Neurosci*, 15, 1663-1668.
- Thomadaki H. & Scorilas A. (2006) BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 43,1-67.
- Toni N., Teng E.M., Bushong E.A., Aimone J.B., Zhao C., Consiglio A., van Praag H., Martone M.E., Ellisman M.H. & Gage F.H. (2007) Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci*, 10, 727-734.
- Trachtenberg J.T., Chen B.E., Knott G.W., Feng G., Sanes J.R., Welker E. & Svoboda K. (2002) Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature*, 420, 788-794.
- Trucco C., Rolli V., Oliver F.J., Flatter E., Masson M., Dantzer F., Niedergang C., Dutrillaux B., Menissier-de Murcia J. & de Murcia G. (1999) A dual approach in the study of poly (ADP-ribose) polymerase: in vitro random mutagenesis and generation of deficient mice. *Mol Cell Biochem*, 193, 53-60.
- Turrigiano G.G. & Nelson S.B. (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 5, 97-107.
- Tuttle R. & O'Leary D.D. (1998) Neurotrophins rapidly modulate growth cone response to the axon guidance molecule, collapsin-1. *Mol Cell Neurosci*, 11, 1-8.
- Uchida K., Hanai S., Ishikawa K., Ozawa Y., Uchida M., Sugimura T. & Miwa M. (1993) Cloning of cDNA encoding Drosophila poly(ADP-ribose) polymerase: leucine zipper in the auto-modification domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 3481-3485.
- Uchiyama Y., Koike M. & Shibata M. (2008) Autophagic neuron death in neonatal brain ischemia/hypoxia. *Autophagy*, 4, 404-408.
- Ueki T., Tanaka M., Yamashita K., Mikawa S., Qiu Z., Maragakis N.J., Hevner R.F., Miura N., Sugimura H. & Sato K. (2003) A novel secretory factor, Neurogenesis-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci*, 23, 11732-11740.
- Ullrich O., Diestel A., Eyupoglu I.Y. & Nitsch R. (2001) Regulation of microglial expression of integrins by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Nat Cell Biol*, 3, 1035-1042.
- Umemori H., Linhoff M.W., Ornitz D.M. & Sanes J.R. (2004) FGF22 and its close relatives are presynaptic organizing molecules in the mammalian brain. *Cell*, 118, 257-270.
- Ushkaryov Y.A., Petrenko A.G., Geppert M. & Sudhof T.C. (1992) Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin. *Science*, 257, 50-56.
- Vahsen N., Cande C., Dupaigne P., Giordanetto F., Kroemer R.T., Herker E., Scholz S., Modjtahedi N., Madeo F., Le Cam E. & Kroemer G. (2006) Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA. *Oncogene*, 25, 1763-1774.
- Van Hoecke M., Prigent-Tessier A.S., Garnier P.E., Bertrand N.M., Filomenko R., Bettaieb A., Marie C. & Beley A.G. (2007) Evidence of HIF-1 functional binding activity to caspase-3 promoter after photothrombotic cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci*, 34,40-47.

-S,T,
U,V-

- Veltkamp R., Rajapakse N., Robins G., Puskar M., Shimizu K. & Busija D. (2002) Transient focal ischemia increases endothelial nitric oxide synthase in cerebral blood vessels. *Stroke*, 33, 2704-2710.
- Vilcek J. & Feldmann M. (2004) Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*, 25, 201-209.
- Virag L. & Szabo C. (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, 54, 375-429.
- von Bernhardi R., Tichauer J.E. & Eugenin J. (2010) Aging-dependent changes of microglial cells and their relevance for neurodegenerative disorders. *J Neurochem*, 112,1099-114.
- Wake H., Moorhouse A.J., Jinno S., Kohsaka S. & Nabekura J. (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*, 29,3974-3980.
- Wang L., Zhang Z., Wang Y., Zhang R. & Chopp M. (2004) Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*, 35,1732-1737.
- Wang T.W., Zhang H. & Parent J.M. (2005) Retinoic acid regulates postnatal neurogenesis in the murine subventricular zone-olfactory bulb pathway. *Development*, 132,2721-2732.
- Wang Q., Tang X.N. & Yenari M.A. (2007) The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*, 184, 53-68.
- Wang Y., Han R., Liang Z.Q., Wu J.C., Zhang X.D., Gu Z.L. & Qin Z.H. (2008) An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. *Autophagy*, 4, 214-226.
- Wang Y., Dawson V.L. & Dawson T.M. (2009) Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol*, 218, 193-202.
- Waterhouse E.G. & Xu B. (2009) New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci*, 42,81-89.
- Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R., Wachtel M.S. & Ginsberg M.D. (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*, 17,497-504.
- Weeks R., Horwitz B., Aziz-Sultan A., Tian B., Wessinger C.M., Cohen L.G., Hallett M. & Rauschecker J.P. (2000) A positron emission tomographic study of auditory localization in the congenitally blind. *J Neurosci*, 20, 2664-2672.
- Weinfeld M., Chaudhry M.A., D'Amours D., Pelletier J.D., Poirier G.G., Povirk L.F. & Lees-Miller, S.P. (1997) Interaction of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase with radiation-induced DNA strand breaks. *Radiat Res*, 148, 22-28.
- White B.C., Sullivan J.M., DeGracia D.J., O'Neil B.J., Neumar R.W., Grossman L.I., Rafols J.A. & Krause, G.S. (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci*, 179, 1-33.
- Wielckens K., Schmidt A., George E., Bredehorst R. & Hilz H. (1982) DNA fragmentation and NAD depletion. Their relation to the turnover of endogenous mono(ADP-ribosyl) and poly(ADP-ribosyl) proteins. *J Biol Chem*, 257, 12872-12877.
- Wieloch T. & Nikolich K. (2006) Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Curr Opin Neurobiol*, 16, 258-264.
- Wiessner C., Gehrmann J., Lindholm D., Topper R., Kreutzberg G.W. & Hossmann K.A. (1993) Expression of transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol*, 86, 439-446.
- Wilhelmsson U., Li L., Pekna M., Berthold C.H., Blom S., Eliasson C., Renner O., Bushong E., Ellisman M., Morgan T.E. & Pekny M. (2004) Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci*, 24,5016-5021.
- Wilson M.T. & Snow D.M. (2000) Chondroitin sulfate proteoglycan expression pattern in hippocampal development: potential regulation of axon tract formation. *J Comp Neurol*, 424, 532-546.

- Wittenberg G.F., Chen R., Ishii K., Bushara K.O., Eckloff S., Croarkin E., Taub E., Gerber L.H., Hallett M. & Cohen L.G. (2003) Constraint-induced therapy in stroke: magnetic-stimulation motor maps and cerebral activation. *Neurorehabil Neural Repair*, 17, 48-57.
- Wolswijk G. (1995) Strongly GD3+ cells in the developing and adult rat cerebellum belong to the microglial lineage rather than to the oligodendrocyte lineage. *Glia*, 13, 13-26.
- Wood P.L. (1995) Microglia as a unique cellular target in the treatment of stroke: potential neurotoxic mediators produced by activated microglia. *Neurol Res*, 17, 242-248.
- Woodhouse B.C. & Dianov G.L. (2008) Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair (Amst)*, 7, 1077-1086.
- Wu S., Gao J., Ohlemeyer C., Roos D., Niessen H., Kottgen E. & Gessner R. (2005) Activation of AP-1 through reactive oxygen species by angiotensin II in rat cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med*, 39, 1601-1610.
- Yamagata M. & Sanes J.R. (2008) Dscam and Sidekick proteins direct lamina-specific synaptic connections in vertebrate retina. *Nature*, 451, 465-469.
- Yamasaki Y., Matsuura N., Shozuhara H., Onodera H., Itoyama Y. & Kogure K. (1995) Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke*, 26, 676-681.
- Yang G.Y., Gong C., Qin Z., Ye W., Mao Y. & Bertz A.L. (1998) Inhibition of TNFalpha attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain. *Neuroreport*, 9, 2131-2134.
- Yao H. & Haddad G.G. (2004) Calcium and pH homeostasis in neurons during hypoxia and ischemia. *Cell Calcium*, 36, 247-255.
- Yazdani U. & Terman J.R. (2006) The semaphorins. *Genome Biol*, 7, 211.
- Yenari M.A., Kauppinen T.M. & Swanson R.A. (2010) Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics*, 7, 378-391.
- Yip H.K., Chang L.T., Chang W.N., Lu C.H., Liou C.W., Lan M.Y., Liu J.S., Youssef A.A. & Chang H.W. (2008) Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke*, 39, 69-74.
- Yoshimizu T. & Chaki S. (2004) Increased cell proliferation in the adult mouse hippocampus following chronic administration of group II metabotropic glutamate receptor antagonist, MGS0039. *Biochem Biophys Res Commun*, 315, 493-496.
- Yoshimura T., Kawano Y., Arimura N., Kawabata S., Kikuchi A. & Kaibuchi K. (2005) GSK-3beta regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell*, 120, 137-149.
- Young W., Rappaport Z.H., Chalif D.J. & Flamm E.S. (1987) Regional brain sodium, potassium, and water changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia. *Stroke*, 18, 751-759.
- Yu S.W., Andrabi S.A., Wang H., Kim N.S., Poirier G.G., Dawson T.M. & Dawson V.L. (2006) Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18314-18319.
- Yuan G., Kaneko M., Masuda H., Hon R.B., Kobayashi A. & Yamazaki N. (1992) Decrease in heart mitochondrial creatine kinase activity due to oxygen free radicals. *Biochim Biophys Acta*, 1140, 78-84.
- Zhang S., Boyd J., Delaney K. & Murphy T.H. (2005) Rapid reversible changes in dendritic spine structure in vivo gated by the degree of ischemia. *J Neurosci*, 25, 5333-5338.
- Zhang J. & Hughes S. (2006) Role of the ephrin and Eph receptor tyrosine kinase families in angiogenesis and development of the cardiovascular system. *J Pathol*, 208, 453-461.
- Zhao B.Q., Wang S., Kim H.Y., Storrie H., Rosen B.R., Mooney D.J., Wang X. & Lo E.H. (2006) Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med*, 12, 441-445.
- Zhu D.Y., Liu S.H., Sun H.S. & Lu Y.M. (2003) Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus. *J Neurosci*, 23, 223-229.
- Zhu Y., Roth-Eichhorn S., Braun N., Culmsee C., Rami A. & Krieglstein J. (2000) The expression of transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in hippocampal neurons: a temporary upregulated protein level after transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res*, 866, 286-298.
- Zivin J.A. (1998) Factors determining the therapeutic window for stroke. *Neurology*, 50, 599-603.

-W,X,
Y,Z-

Zou H., Li Y., Liu X. & Wang X. (1999) An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, 274, 11549-11556.

-Z-

Titre : Influence de la microglie et du BDNF sur l'induction de la neuroplasticité après un accident vasculaire cérébral ischémique

Résumé

L'émergence de la notion selon laquelle la réponse inflammatoire exercerait des effets bénéfiques dans la pathologie ischémique cérébrale, en particulier au cours de la phase de récupération fonctionnelle nous a conduit à étudier l'implication des cellules microgliales dans le déclenchement des mécanismes de neuroplasticité post-ischémique. Notre étude a été réalisée chez le Rat soumis à une ischémie focale permanente induite par photothrombose. L'activation microgliale a été modulée par un traitement au 3-aminobenzamide (3-AB), un inhibiteur spécifique de la poly(ADP-ribose)polymérase-1, jouant un rôle prépondérant dans l'activation de ces cellules. Nos données montrent que le 3-AB entraîne une diminution importante de l'activation microgliale aux temps courts associée à plus long terme à une réduction de l'expression de la synaptophysine et de GAP-43, respectivement marqueurs des processus de synaptogenèse et croissance axonale. L'ensemble de ces données indique donc que les cellules microgliales constituent effectivement des acteurs cellulaires essentiels de la neuroplasticité post-ischémique. Le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) se révélant un candidat potentiellement capable de promouvoir de tels changements, nous avons pu mettre en évidence que ces cellules représentaient de façon précoce une source importante de BDNF. Ces résultats ont été confirmés par une nette diminution des taux de BDNF mesurés dans les zones corticales lésionnelles et péri-lésionnelles des animaux traités par le 3-AB. Dans un deuxième temps, le métabolisme complexe de cette neurotrophine à travers l'existence de deux formes, pro- et mature, aux effets biologiques opposés, nous a conduit à réaliser une étude spatio-temporelle des expressions post-ischémiques du BDNF total (ELISA), pro- et mature (Western blotting). Aux temps courts (4-24 h), les expressions du BDNF total, pro- et mature sont augmentées dans les territoires corticaux lésés, péri-lésionnels et homotopiques tandis qu'aux temps longs (8-30 j), le BDNF total reste accru dans les régions distantes de la zone infarctée (hippocampes et cortex contralatéral). Concernant les expressions des formes pro- et mature, nos résultats indiquent une augmentation entre 8 et 30 j uniquement dans les territoires hippocampiques. D'un point de vue cellulaire, le BDNF est exprimé du côté ipsilatéral dans les neurones et les cellules non neuronales tandis que du côté contralatéral, l'expression est limitée aux neurones. Nos résultats tout en faisant apparaître des divergences importantes dans les variations d'expressions du BDNF total (ELISA) et des différentes formes (Western blotting) indiquent que la mesure du BDNF total doit être couplée à une étude permettant de discriminer les deux formes. De plus, tout en confirmant l'implication de cette neurotrophine dans les mécanismes adaptatifs induits en réponse à une ischémie cérébrale, ces données suggèrent que les territoires distants de la zone lésée jouent un rôle majeur dans ces processus.

Mots clés : AVC expérimental - Microglie - Inflammation - BDNF - Neuroplasticité - Synaptogenèse - Croissance axonale

Titre : Microglial and BDNF impact on the induction of the post ischemic neuroplasticity.

Abstract

Evidences showing that under certain circumstances, inflammatory response could be neuroprotective and could also promote adult neurogenesis are growing. In this context, the objective of this work was to investigate the impact of microglial cells in the neuroplastic events. Rats were subjected to photothrombotic ischemia and microglial cells activation was blocked by the mean of poly(ADP-ribose)polymérase-1 (PARP-1) inhibition using 3-aminobenzamide (3-AB) since this protein has been shown to play a major role in this activation. Our results show that PARP-1 activity reduction was associated with a strong repression of the acute microglial activation. Beside, 3-AB treated animals exhibited a decrease in synaptophysin (synaptogenesis) and GAP-43 (axonal growth) expressions. Taken together, our data argue for a supportive role of microglial in adaptive brain plasticity events. According to the preponderant contribution of BDNF in these events, assessment of its cellular localization was performed, and confirmed that these cells represent a significant source. Beside, BDNF immunoreactivity (IR) in microglial cells and BDNF levels in the lesioned and surrounding lesioned areas were found decreased in 3-AB treated animals. However, since this neurotrophin can exert ambivalent biological actions through pro-versus mature forms, we investigate the proper effect of cerebral ischemia on total (Elisa), pro- and mature (Western blotting) expressions. Our results show that total, pro- and mature BDNF expressions are augmented in the early times (4-24h) of ischemia within the lesioned, the surrounding non lesioned and the contralateral cortical areas. At longer time points, total BDNF was still increased at 8d in regions distant from the lesion (hippocampi and contralateral cortex) while pro- and mature forms rise between 8d to 30d in hippocampic territories only. In term of cellular distribution, BDNF-IR was found in neurons but also in non neuronal cells ipsilaterally whereas in the opposite side BDNF staining was restricted to neurons. Our data while raising the question of the pertinence of total BDNF expression in a context of studying its supportive potential action indicate that such assessment has to be coupled with the discrimination of both forms. In addition, our data confirm the important role of BDNF in post-stroke adaptive mechanisms and argue in favour of an important contribution of the hippocampal territory and of the contralateral hemisphere in BDNF related post-stroke neuronal circuit remodelling suggesting that strategies targeting this hemisphere are likely to mediate functional compensation.

Key words: Experimental stroke - Microglia - Inflammation - BDNF - Neuroplasticity - Synaptogenesis - Axonal growth

Auteur : Madinier Alexandre

INSERM U887 "Motricité Plasticité"
UFR Pharmacie – 7 bd Jeanne d'Arc
BP 87900, 21079