



Infarctus cérébral et plasticité : focus sur le BDNF

Yannick Béjot

► To cite this version:

Yannick Béjot. Infarctus cérébral et plasticité : focus sur le BDNF. Médecine humaine et pathologie. Université de Bourgogne, 2011. Français. NNT : 2011DIJOMU01 . tel-00939908

HAL Id: tel-00939908

<https://theses.hal.science/tel-00939908>

Submitted on 31 Jan 2014

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.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Ecole Doctorale Environnement Santé STIC, U887 Motricité-Plasticité

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Médecine

par Yannick Béjot

le 12 Décembre 2011

Infarctus cérébral et plasticité

Focus sur le BDNF

Directeur de Thèse
Professeur Christine Marie

Co-directeur deThèse
Professeur Maurice Giroud

Jury :

Professeur Didier Leys	Université Lille 2	Président
Professeur Isabelle Margail	Université Paris Descartes	Rapporteur
Professeur Jean-Louis Mas	Université Paris Descartes	Rapporteur
Professeur Christine Marie	Université de Bourgogne	Examineur
Professeur Maurice Giroud	Université de Bourgogne	Examineur

Remerciements

Je remercie Madame le Professeur Christine Marie, Professeur de Physiologie à la Faculté de Pharmacie de Dijon, de m'avoir initié à la recherche fondamentale et encadré durant mon année recherche et ces 3 années de Thèse. Sans votre soutien et vos conseils, cette Thèse n'aurait pas pu voir le jour.

Je remercie le Professeur Maurice Giroud, Professeur de Neurologie, Chef du Service de Neurologie du CHU de Dijon, d'avoir co-encadré cette Thèse. Votre soutien depuis le début de mon internat et votre enthousiasme est une source de motivation permanente qui me permet d'avancer. Vous êtes un exemple pour vos collaborateurs.

Je remercie le Professeur Didier Leys, Professeur de Neurologie, Chef du Service de Neurologie et Pathologie Neurovasculaire du CHU de Lille, d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance de Thèse.

Je remercie le Professeur Jean-Louis Mas, Professeur de Neurologie, Chef du Service de Neurologie du Centre Hospitalier Sainte-Anne, Paris, et Madame le Professeur Isabelle Margaill, Professeur de Physiologie à la Faculté de Pharmacie Paris Descartes, d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de Thèse.

Je remercie l'ensemble des membres de l'équipe « Modèle Animal » de l'U887 dirigée par Madame le Professeur Christine Marie pour leur accueil chaleureux durant l'année passée à leurs côtés. Merci particulièrement à Monsieur Claude Mossiat, qui m'a appris les techniques et la rigueur des études animales.

Je remercie l'ensemble de mes collaborateurs du Service de Neurologie du CHU de Dijon pour leur soutien constant : « la recherche est possible grâce à ceux qui n'en font pas ».

Je remercie mes parents, mon frère et ma sœur, ma famille et mes amis qui ont toujours été présents pour moi. Cette Thèse leur est dédiée.

Enfin, je remercie Odile qui partage ma vie depuis toutes ces années : ton amour est essentiel à mon équilibre et sans toi, ces lignes n'auraient pas été écrites...

Résumé

La récupération fonctionnelle des patients victimes d'un accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est largement sous-tendue par les propriétés plastiques du cerveau et plus précisément par sa capacité à remodeler les réseaux de neurones épargnés par l'infarctus. Les études réalisées sur différents modèles animaux d'infarctus cérébral s'accordent à montrer que ces changements plastiques sont induits par le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Aussi, augmenter les taux cérébraux de BDNF est considéré comme une stratégie thérapeutique prometteuse de réduction des déficiences post-AVC. Dans ce contexte, notre travail avait 2 objectifs : 1) chez le rat, identifier les cellules impliquées dans la surproduction de BDNF et évaluer la pertinence de la mesure des taux circulants de BDNF pour estimer les taux de BDNF présents dans le cerveau, 2) chez le patient victime d'un infarctus cérébral, étudier l'efficacité de la fluoxétine sur la récupération motrice à 3 mois, la fluoxétine étant un inhibiteur spécifique de la recapture de la sérotonine commercialisé comme antidépresseur et capable non seulement d'augmenter la production cérébrale de BDNF mais aussi de stimuler la plasticité post-lésionnelle.

Les études précliniques ont été réalisées chez le rat soumis à l'embolisation unilatérale du cerveau par un nombre variable de microsphères (en carbone et calibrées à 50 μ m) afin de reproduire le large panel de souffrance cérébrale rencontré en clinique. Le BDNF a été mesuré dans le cerveau et dans le sang (plasma et sérum par technique ELISA) avant et après (4, 24h et 8j) embolisation. Nos résultats montrent :

- que la production de BDNF est plus intense et plus durable dans l'hémisphère embolisé que dans l'hémisphère non embolisé et que cette production est indépendante du degré d'embolisation, marqueur indirect de la souffrance cérébrale.
- que les cellules non-neuronales deviennent une source non négligeable de BDNF en cas d'ischémie, notamment les cellules endothéliales et microgliales avant 24h et les astrocytes au temps 8j.
- que les taux circulants et cérébraux de BDNF ne sont pas corrélés mais qu'il existe une corrélation entre le BDNF plasmatique mesuré au temps 4h et le degré d'embolisation.

L'étude clinique correspond à un essai randomisé contrôlé en double aveugle comparant la fluoxétine (20mg/j, voie orale, pendant 3 mois et débutée entre 5 et 10j après les premiers symptômes) au placebo chez des patients présentant un déficit moteur modéré à sévère sur l'échelle motrice de Fugl-Meyer (n=59 dans chaque groupe). Nos résultats montrent que l'amélioration de la fonction motrice est meilleure sous fluoxétine que placebo.

En conclusion, notre travail montre l'intérêt des médicaments capables d'augmenter le BDNF et la plasticité post-lésionnelle pour améliorer le pronostic clinique de l'AVC et identifie pour la première fois les cellules endothéliales cérébrales comme une cible potentielle de ces médicaments. Il remet également en cause l'idée largement répandue selon laquelle les taux circulants de BDNF varient dans le même sens que les taux cérébraux.

Mots clés : accident vasculaire cérébral ; infarctus cérébral ; BDNF ; plasma ; sérum ; rat ; plasticité ; fluoxétine ; récupération motrice

Abstract

Functional recovery after ischemic stroke largely involves brain plasticity and more accurately its ability to reorganize the neuronal networks spared by the infarct. Studies conducted on animals using different ischemic stroke models have demonstrated that plastic changes are induced by BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor). Hence, increasing levels of BDNF in the brain is considered a promising therapeutic strategy to reduce post-stroke impairments. In this context, our work had 2 aims: 1) In a rat model, to identify cells involved in the over-production of BDNF and to evaluate the pertinence of the measurement of circulating BDNF levels to estimate brain BDNF levels; 2) In ischemic stroke patients, to study the effectiveness of fluoxetine on 3-month motor recovery. This drug is a selective serotonin-reuptake inhibitor commercialized as an antidepressant treatment that is not only able to increase brain production of BDNF, but also to stimulate post-lesion plasticity.

Animal studies were performed on rats that underwent unilateral embolization of the brain with various amounts of carbonized calibrated (50 μ m) microspheres in order to mimic the large panel of brain injury observed in humans. BDNF levels were measured in the brain and the blood (plasma and serum, ELISA method) before and after (4, 24h, and 8d) embolization. Our results show that:

- The production of BDNF was more intense and longer lasting in the embolized than in the non-embolized hemisphere, and this production was independent of the degree of embolization, an indirect marker of brain injury.
- Several non-neuronal cells become a non-negligible source of BDNF after ischemia, particularly endothelial cells and microglia before 24h, and astrocytes at 8d.
- Brain and circulating levels of BDNF did not correlate, but a correlation between plasma BDNF at 4h and the degree of embolization was noted.

Our clinical study was a randomized placebo-controlled trial that evaluated the efficacy of fluoxetine (20mg/d, oral route, over 3 months, and starting between 5 and 10d after stroke onset) in patients with moderate to severe motor impairment measured by the Fugl-Meyer motor scale (n=59 in each group). Our results showed a greater improvement in motor recovery under fluoxetine than placebo.

To conclude, our work underlines the fact that treatments able to increase BDNF levels and post-lesion brain plasticity are of interest to improve the prognosis after stroke. We have shown, for the first time, that endothelial cells are a potential target for these treatments. Our study also calls into question the widespread idea according to which circulating levels of BDNF vary in the same way as levels of BDNF in the brain.

Keywords: stroke ; cerebral infarct ; BDNF plasma ; serum ; rat ; plasticity ; fluoxetine ; motor recovery

Table des matières

<u>Liste des abréviations</u>	p.8
<u>Introduction</u>	p.9
<u>Etat de l'art</u>	p.11
I- Les accidents vasculaires cérébraux	p.12
A- Définition et types d'accidents vasculaires cérébraux	p.12
B- Incidence et prévalence des accidents vasculaires cérébraux	p.14
C- Formation de l'infarctus cérébral	p.14
D- Pronostic des patients après un infarctus cérébral	p.17
1- Données épidémiologiques	p.17
2- Facteurs pronostiques	p.18
<i>a- Marqueurs reconnus</i>	p.18
<i>b- Marqueurs controversés</i>	p.20
<i>c- Taux sanguins des protéines dérivées du cerveau</i>	p.21
<i>d- Protéines de l'inflammation</i>	p.22
<i>e- Autres marqueurs d'imagerie et de neurophysiologie</i>	p.22
E- Prise en charge de l'infarctus cérébral à la phase aiguë	p.23
II- Plasticité cérébrale	p.24
A- Définition et mécanismes	p.24
B- Méthodes d'études	p.24
1- Pré-mortem	p.24
<i>a- Imagerie cérébrale</i>	p.24
<i>b- Electrophysiologie</i>	p.25
2- Post-mortem	p.27
C- Plasticité et récupération fonctionnelle post-AVC	p.27
1- Récupération spontanée	p.27
2- Récupération induite	p.28
<i>a- Thérapie par le mouvement</i>	p.28
<i>b- Thérapie de neurostimulations</i>	p.29
<i>c- Thérapie médicamenteuse</i>	p.30
III- Le Brain-Derived Neurotrophic Factor	p.32
A- BDNF cérébral	p.33
1- Répartition et localisation cellulaire du BDNF dans l'organisme	p.33
2- Synthèse et sécrétion	p.33
3- Transport axonal	p.36
4- Récepteurs du BDNF	p.38

5- Effets physiologiques	p.39
B- BDNF circulant	p.41
1- Origine	p.41
2- Déterminants	p.43
C- BDNF et maladies neurologiques et psychiatriques chroniques	p.45
1- BDNF et dépression	p.45
2- BDNF et Maladie d'Alzheimer	p.46
3- BDNF et Maladie de Parkinson	p.47
4- BDNF et Maladie de Huntington	p.47
D- BDNF et accident vasculaire cérébral	p.48
1- Effets de l'ischémie sur les taux cérébraux de BDNF	p.48
2- Source cellulaire du BDNF néosynthétisé dans le cerveau	p.52
3- BDNF circulant et accident vasculaire cérébral	p.52
4- Rôle du BDNF endogène en cas d'ischémie cérébrale	p.54
<u>Méthodologie</u>	p.57
I- Etudes animales	p.58
A- Animaux	p.58
B- Techniques physiologiques	p.58
1- Modèle d'ischémie multifocale permanente par embolisation	p.58
<i>a- Induction de l'ischémie</i>	p.58
<i>b- Détermination du degré d'embolisation</i>	p.59
2- Prélèvements sanguins	p.60
3- Prélèvements cérébraux	p.61
<i>a- Prélèvements cérébraux pour dosage du BDNF</i>	p.61
<i>b- Prélèvements cérébraux pour études immuno-histochimiques</i>	p.61
C- Dosages du BDNF circulant et tissulaire	p.62
1- Préparation des échantillons tissulaires pour dosage du BDNF	p.62
2- Réalisation des dosages du BDNF circulant et tissulaire	p.62
D- Etude de la localisation cellulaire du BDNF	p.63
E- Etude de l'expression de GFAP	p.64
II- Etude clinique	p.65
A- Sélection des participants	p.65
B- Procédures	p.66
<u>Présentation des travaux</u>	p.68
I- Etude 1 : Contribution des cellules non neuronales à la production du BDNF après un infarctus cérébral. Etude cinétique chez le rat.	p.69
A- Objectifs de l'étude	p.69
B- Méthodes	p.69

C- Principaux résultats	p.70
Publication originale	p.71
II- Etude 2 : Taux cérébraux et circulant du BDNF après une ischémie cérébrale chez le rat	p.81
A- Objectifs de l'étude	p.81
B- Méthodes	p.81
C- Principaux résultats	p.82
Publication originale	p.83
III- Etude 3 : Effet de la Fluoxetine sur la récupération motrice après un infarctus cérébral aigu : essai randomisé contrôlé contre placebo.	p.101
A- Objectifs de l'étude	p.101
B- Principaux résultats	p.101
Publication originale	p.103
<u>Conclusion</u>	p.111
<u>Bibliographie</u>	p.118

Liste des abréviations

ARNm : Acide Ribonucléique Messenger
AVC : Accident Vasculaire Cérébral
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique
FMMS : Fugl-Meyer Motor Scale
IRMf : Imagerie par Résonance Magnétique Fonctionnelle
IRSS : Inhibiteur Sélectif de la Recapture de la Sérotonine
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LTP : Potentialisation à Long Terme
MADRS : Montgomery Asberg Rating Scale
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
MEG : Magnéto-Encéphalographie
MMP : Matrix Metalloproteinase
mRS : Modified Rankin Scale
NGF : Nerve Growth Factor
NIHSS : National Institutes of Health Stroke Scale
NIRS : Near-Infrared Spectroscopy (spectroscopie proche infrarouge)
NT3 : Neurotrophin 3
NT4 : Neurotrophin 3
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PEM : Potentiels Evoqués Moteurs
p75^{NTR} : p75 Neurotrophin Receptor
SMT : Stimulation Magnétique Trans-crânienne
SMT_r : Stimulation Magnétique Trans-crânienne Répétitive
SNC : Système Nerveux Central
TEP : Tomographie par Emission de Positons
t-PA : Tissue Plasminogen Activator
TrkB : Tropomyosin-Related Kinase Receptor type B

Introduction

L'accident vasculaire cérébral (AVC) d'origine ischémique représente la première cause de handicap acquis chez l'adulte même si le déficit fonctionnel régresse de façon spontanée (en l'absence de médicaments) chez la majorité des patients, surtout durant les 3 premiers mois qui suivent les premiers symptômes. L'espoir d'une récupération fonctionnelle plus rapide et plus complète repose actuellement sur le développement de stratégies visant à augmenter les taux cérébraux de Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), un promoteur unanimement reconnu de la plasticité cérébrale. En effet, sur les modèles animaux d'ischémie cérébrale, les stratégies qui augmentent les taux de BDNF dans le cerveau (qu'elles soient ou pas pharmacologiques) réduisent le déficit sensorimoteur sans toutefois affecter le volume de lésion. Ces données montrent l'importance de mieux connaître le BDNF en cas d'ischémie cérébrale d'une part et d'évaluer l'intérêt pour le patient des stratégies ciblant le BDNF.

Un premier travail réalisé sur un modèle rat d'infarctus cérébral permettant de moduler la sévérité de l'ischémie a eu comme objectif a) d'identifier les cellules qui produisent le BDNF dans les premiers 8 jours qui suivent l'induction d'ischémie, b) d'étudier durant cette même période la relation existant entre les taux cérébraux et circulants de BDNF. En effet, alors que le BDNF est dosé dans le sang chez l'Homme et dans le cerveau chez l'animal, on ne sait pas si les taux circulants reflètent les taux cérébraux après un AVC ni si la relation éventuelle est influencée par la sévérité de l'accident ischémique.

Un second travail réalisé chez le patient victime d'un infarctus cérébral a été consacré à évaluer l'effet de la fluoxétine (1 prise/j, 90 jours consécutifs) sur le déficit moteur à 3 mois. La fluoxétine est un inhibiteur de la recapture de la sérotonine commercialisé comme antidépresseur (PROZAC) qui augmente la production de BDNF par le cerveau ischémique chez l'animal et induit un remodelage des cartes corticales chez le patient victime d'un AVC.

Le document débute par un état de l'art, puis se poursuit successivement par la description détaillée des méthodes utilisées et par la présentation de nos travaux personnels (insertion des publications). Il se termine par une conclusion générale qui analyse de façon critique les principaux résultats obtenus.

Etat de l'art

I- Les accidents vasculaires cérébraux

A- Définition et types d'accidents vasculaires cérébraux

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit l'accident vasculaire cérébral (AVC) comme « le développement rapide de signes cliniques localisés ou globaux de dysfonction cérébrale avec des symptômes durant plus de 24 heures, pouvant conduire à la mort, sans autre cause apparente qu'une origine vasculaire » (WHO, 2000). Cette définition exclut l'accident ischémique transitoire (AIT) caractérisé par « la perte brutale d'une fonction cérébrale ou oculaire durant moins de 24 heures supposée due à une embolie ou à une thrombose vasculaire » (WHO, 2000). Néanmoins, cette définition « historique » de l'AIT impliquant une durée fixée de manière arbitraire a été reconsidérée depuis, sur la base de plusieurs arguments cliniques et paracliniques. Ainsi, une très large majorité des AIT durent moins de 1 heure, parmi lesquels la plupart durent même moins de 30 minutes (Weisberg, 1991). De plus, moins de 15 % des patients présentant des symptômes durant plus de 1 heure vont récupérer dans les 24 heures (Levy, 1988). Par ailleurs, les progrès de l'imagerie cérébrale, en particulier l'apport de l'imagerie par résonance magnétique (IRM), plus performante que le scanner, ont permis de mettre en évidence des lésions d'infarctus cérébral chez des patients victimes d'un AIT, et ce d'autant plus fréquemment que la durée des symptômes avait été longue (Engelter et al., 1999). Ces données ont conduit le TIA Working Group à redéfinir l'AIT comme « un épisode neurologique déficitaire de survenue brutale causé par une ischémie focale du cerveau ou de la rétine, dont les symptômes durent typiquement moins d'une heure, et sans signe d'infarctus cérébral aigu » (Albers et al., 2002). Cette nouvelle définition est tributaire de l'imagerie cérébrale et est difficilement applicable dans le cadre des études épidémiologiques. Elle a par contre le mérite de souligner qu'il existe un continuum entre l'AIT et l'infarctus cérébral qui sont, en fait, deux maladies identiques.

L'AVC est une pathologie hétérogène. Il regroupe à la fois les infarctus cérébraux qui sont secondaires à une ischémie prolongée et les hémorragies cérébrales qui résultent de la rupture d'un vaisseau cérébral sous-arachnoïdien ou intraparenchymateux. Dans les pays occidentaux, les infarctus cérébraux représentent 80 à 90% de l'ensemble des AVC. Par ailleurs, une hétérogénéité est également retrouvée au sein même des infarctus cérébraux. En effet, ceux-ci regroupent des maladies d'origine, de symptomatologie, de traitement et

d'évolution très différents. Ainsi, plusieurs classifications des sous-types d'infarctus ont été établies. La classification « TOAST » est une classification basée sur l'étiologie de l'ischémie et est actuellement la plus communément utilisée (Adams et al., 1993). Elle distingue 5 sous-types étiologiques d'infarctus cérébraux (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification TOAST des sous-types d'infarctus cérébraux.

Sous-type ischémique	Description	Fréquence
1. Athérosclérose des grosses artères	Occlusion ou sténose (>50%) d'une artère cérébrale majeure ou d'une branche corticale, secondaire à des lésions d'athérosclérose	15-30 %
2. Embolie cardiaque	Au moins une source cardiaque d'embolie identifiée. Les sources cardiaques sont divisées en risque élevé et moyen d'embolie	20-25%
3. Infarctus lacunaire	Atteinte des artérioles de petit calibre (diamètre <400 µm). Infarctus de taille <1.5 cm à l'imagerie sans source cardiaque d'embolie ni lésion significative d'athérosclérose des grosses artères identifiées.	15-25%
4. Autres causes	Autre cause rare identifiée : dissections artérielles, angéites cérébrales, troubles hématologiques, états d'hypercoagulation, maladies génétiques...	5%
5. Cause indéterminée	Plusieurs mécanismes co-existent, ou aucune cause n'est retrouvée après un bilan étiologique complet, ou bilan incomplet	15-30%

B- Incidence et prévalence des accidents vasculaires cérébraux

Chaque jour, en France, 360 personnes sont victimes d'un AVC (Leys et al., 2008 ; Béjot et al. 2010). Les chiffres d'incidence des AVC en France proviennent du Registre Dijonnais des AVC faisant état de taux actuels d'environ 120 cas/100.000 habitants/an (Béjot et al., 2009a ; Béjot et al., 2009b). De plus, à partir des données du Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information (PMSI), on estime à environ 125.000 le nombre de personnes hospitalisées tous les ans pour un AVC (Béjot et al., 2010). A travers le monde, ce sont 16 millions de nouveaux cas qui sont observés chaque année (Strong et al., 2007), avec une incidence annuelle variable, allant de 100 à 300 cas/100.000 habitants avec de grandes disparités entre les pays (Feigin et al., 2009).

Très peu d'études de prévalence sont disponibles. Dans une revue d'études conduites avant 2003, Feigin rapportait une prévalence annuelle standardisée à l'âge chez les sujets de plus de 65 ans variant de 45 à 74/1000 habitants (Feigin et al., 2003). Selon Hankey et Warlow (1999) et dans une population de 1 million d'habitants issus d'un pays développé, on recense chaque année 1 700 patients survivants à leur AVC qui s'ajoutent à un groupe d'environ 12 000 patients qui ont des antécédents d'AVC ou d'AIT.

Le vieillissement de la population et l'émergence des pays en voie de développement conduira prochainement à une accentuation du phénomène. Ainsi, à partir des données disponibles de l'OMS, il a été estimé que le nombre annuel d'AVC incidents dans le monde atteindra 23 millions à l'horizon de 2030. En 2005, le nombre de survivants à un AVC était de 62 millions ; il sera de 77 millions dans 25 ans (Strong et al., 2007).

C- Formation de l'infarctus cérébral

En cas d'ischémie suffisamment sévère et prolongée, la région cérébrale hypoperfusée évolue, en dehors de toute intervention pharmacologique, rapidement et inexorablement vers l'infarctus c'est à dire la destruction complète du territoire ischémié (mort des neurones, des cellules gliales et des cellules endothéliales). Le volume de l'infarctus évolue dans le temps et

dans l'espace : d'abord une phase de maturation durant laquelle l'infarctus grossit puis une phase de cicatrisation durant laquelle le volume du territoire infarci successivement envahi par la microglie, les monocytes puis les astrocytes régresse (Demougeot et al., 2003). Aux temps longs, la cicatrice astrocytaire est à peine visible et l'atrophie du cerveau devient le seul témoin d'un infarctus ancien. Au niveau de la lésion, l'intégrité de la barrière hématoencéphalique (BHE) est mise à mal. Il en résulte la formation d'un œdème vasogénique conséquence de l'ouverture de la BHE aux protéines circulantes et de son augmentation de la perméabilité à l'eau (perte de l'étanchéité des jonctions existant entre les cellules endothéliales des capillaires sanguins du cerveau). L'œdème vasogénique est redoutable car massif il engage le pronostic vital du patient par effet de masse. La destruction de la lame basale sur laquelle repose les cellules endothéliales formant la BHE est à l'origine de la transformation hémorragique de l'infarctus

Chez l'homme, le diagnostic positif de l'infarctus cérébral en phase aiguë se base sur les résultats de l'imagerie. L'IRM permet le diagnostic différentiel entre accident ischémique et hémorragique, les séquences pondérées en T2 et T1 permettant d'écarter une cause non vasculaire. En outre, l'IRM de diffusion qui étudie les mouvements browniens des molécules d'eau, permet le diagnostic précoce (< 1h) de l'œdème cytotoxique, qui correspond au passage de l'eau du secteur extra au secteur intracellulaire en réponse à une augmentation de l'osmolalité intracellulaire (Oppenheim et al., 2005). Le couplage de la diffusion à la technique de perfusion permet en théorie de repérer le tissu hypoperfusé mais encore viable (zone de pénombre correspondant à une zone menacée de mourir en l'absence d'intervention pharmacologique). Le scanner cérébral, moins sensible que l'IRM pour le diagnostic de l'infarctus cérébral, reste en France l'imagerie réalisée dans la plupart des centres hospitaliers.

Chez l'animal, le volume de lésion et l'œdème vasogénique sont le plus souvent déterminés en post-mortem par technique histologique après utilisation de colorants vitaux ou mesure de la différence poids frais-poids sec du cerveau. Le développement de l'imagerie cérébrale « petit animal » offre cependant la possibilité de visualiser la lésion en pré-mortem selon les modalités utilisées en clinique, mais seuls quelques centres disposent de l'équipement nécessaire.

L'espoir de réduire le handicap associé à l'infarctus cérébral a longtemps reposé sur la neuroprotection, c'est-à-dire l'ensemble des stratégies thérapeutiques permettant d'interrompre ou ralentir la cascade biochimique néfaste qui conduit à la mort neuronale (Ginsberg, 2008). Aussi, de nombreux travaux ont été consacrés à l'identification des maillons de cette cascade. Parmi les événements cytotoxiques les plus documentés, on peut citer, par ordre chronologique d'étude, le déficit énergétique et l'acidose lactique, l'accumulation intracellulaire de calcium, l'excitotoxicité du glutamate, le stress oxydant, la production excessive de monoxyde d'azote, l'activation de l'apoptose et l'inflammation locale. Chez l'animal, les stratégies pharmacologiques capables de réduire l'intensité de ces événements conduisent bien à une réduction du volume de lésion mesuré dans la phase aiguë ou subaiguë. En revanche, ces stratégies se sont révélées incapables de réduire la mortalité ou le déficit fonctionnel des patients victimes d'un AVC (Ginsberg, 2008). Plusieurs raisons ont été évoquées pour expliquer ces divergences :

- Modèles animaux d'infarctus non-pertinents. On peut noter ici le fait que la majorité des études conduites chez l'animal font appel à des modèles d'ischémie focale réversible alors que la reperfusion spontanée n'est observée que chez environ un tiers des patients (Davis et al., 2008)
- Inclusion dans les études cliniques de patients très hétérogènes sur le plan de la localisation et du volume de lésion, des anomalies biologiques associées (hypertension, diabète etc...), du traitement médicamenteux en cours, de leur niveau d'activité physique alors que l'infarctus, reproductible en taille et localisation, est induit chez des animaux sains et identiques sur le plan biologique.
- Modalités d'administration du traitement différentes entre Homme et animal. Souvent chez l'animal, le traitement est administré avant induction de l'ischémie ou à la levée de l'ischémie alors que chez l'Homme le délai d'administration est bien plus retardé.
- Mauvaise analyse statistique des résultats.
- Critère d'efficacité du traitement différent : fonctionnel (réduction du déficit neurologique ou de la mortalité à 3 ou 6 mois) chez l'Homme et histologique (volume de lésion en phase aiguë) chez l'animal. Ce point est important car le déficit fonctionnel à long terme n'est pas seulement influencé par le volume initial de la lésion mais aussi par les qualités plastiques du cerveau.

Il existe actuellement un regain d'intérêt pour la cytoprotection de la cellule endothéliale formant les capillaires sanguins du cerveau (Guo et al., 2008 ; Del Zoppo, 2009). Ce regain d'intérêt pour la cellule endothéliale est concomitant de l'émergence du concept d'unité neurovasculaire (Iadecola, 2004), terme créé pour mettre en lumière l'interaction fonctionnelle existant entre les cellules endothéliales des capillaires, les neurones et les cellules gliales, notamment les astrocytes dont les expansions cytoplasmiques s'enroulent autour des capillaires.

D- Pronostic des patients après un infarctus cérébral

1- Données épidémiologiques

D'une manière générale, l'AVC représente la première cause de handicap, la deuxième cause de démence et la troisième cause de mortalité dans les pays industrialisés. Ainsi, 6 mois après un tel accident, 20 à 30% des patients sont décédés, 20 à 30% présentent un handicap invalidant, 20% à 25% un handicap modéré, les autres ayant complètement récupéré sur le plan moteur (American Heart Association, 2009). En 2005, le nombre de décès annuels mondiaux liés aux AVC était de 5,7 millions et il atteindra 7,8 millions en 2030 (Strong et al., 2007).

De manière plus spécifique, l'infarctus cérébral est associé à un pronostic péjoratif sur le plan vital. Ainsi, la mortalité à 1 mois des patients est de l'ordre de 15 à 20% avec de grandes disparités observées à travers le monde (Feigin et al., 2009). Un patient sur deux décède dans les 5 ans suivant l'infarctus cérébral (Béjot et al., 2009a). Néanmoins, le pronostic des patients s'est amélioré au cours des 2 dernières décennies (Béjot et al., 2007 ; Feigin et al., 2009) reflétant ainsi l'amélioration de la prise en charge des patients à la phase aiguë, notamment par l'organisation de filières de soin dédiées, la mise en place d'unités de soins intensifs de neurologie vasculaire, et l'utilisation de la fibrinolyse intraveineuse par rt-PA, forme recombinée du t-PA, seul traitement médicamenteux validé ayant fait la preuve de son efficacité (Hacke et al., 2008).

L'infarctus cérébral est également associé à un mauvais pronostic fonctionnel. Entre 15 et 30% des patients survivant après un infarctus cérébral gardent des séquelles motrices ou

aphasiques sévères (American Heart Association, 2009). Plus récemment, la prise en compte des conséquences cognitives des infarctus cérébraux a émergé. Une méta-analyse a révélé que 7 à 23% des patients vont développer une démence dans l'année suivant un premier AVC (Pendlebury et Rothwell, 2009). Au sein du Registre Dijonnais des AVC, nous avons retrouvé une prévalence de démence précoce de 23% après un infarctus cérébral (Béjot et al., 2011a). Enfin, il est estimé qu'environ 30% des patients victimes d'un AVC souffriront d'une dépression (Lenzi et al., 2008).

2- Facteurs pronostiques

La récupération fonctionnelle après un infarctus cérébral est un phénomène quasi-constant mais dont le décours temporel et l'intensité restent imprévisibles. Si l'essentiel de la récupération fonctionnelle est observée dans les 3 premiers mois suivant l'infarctus cérébral, un certain nombre de patients continuent à progresser au-delà de cette période sans qu'aucun critère ne permette à l'heure actuelle d'identifier précocement ces patients. Face à ce caractère imprévisible de la récupération fonctionnelle, les cliniciens se sont attachés à identifier des marqueurs pronostiques.

a- Marqueurs reconnus

▪ Déficit neurologique initial

En pratique clinique, le déficit neurologique initial est mesuré par différentes échelles neurologiques dont l'échelle National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS), la Scandinavian Stroke Scale (SSS), la Canadian Stroke Scale (CSS) ou encore l'échelle de Rankin modifiée (mRS). De nombreux travaux ont démontré qu'un déficit neurologique sévère à l'admission représente un marqueur fort de risque de mauvais pronostic à court terme (Jorgensen et al., 1996 ; DeGraba et al., 1999 ; Shelton et al., 2001 ; Ahmed et al., 2004 ; Luk et al., 2006), moyen terme (German Stroke Study Collaboration 2004 ; Weimar et al., 2004 ; Nuutinen et al., 2006) ou encore long terme (Patel et al., 2000). De plus, l'existence d'une détérioration neurologique entre l'admission et les premiers jours qui suivent augmente le risque de séquelles graves (Sumer et al., 2003 ; Kwan et al., 2006).

- Hyperthermie

Dans une méta-analyse récente portant sur 39 études cliniques incluant plus de 14000 patients, la présence d'une hyperthermie à la phase aiguë d'un infarctus cérébral était associée à une augmentation du risque de handicap variant de 40 à 120% en fonction de l'échelle utilisée (Greer et al., 2008). Ces données ont conduit aux recommandations actuelles indiquant la normalisation de la température corporelle par un antipyrétique chez les patients présentant un infarctus cérébral (European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee, 2008) bien que les résultats des essais visant à évaluer cette stratégie thérapeutiques soient discordants (Kallmünzer et Kollmar, 2011).

- Hyperglycémie

L'hyperglycémie est une complication fréquente touchant jusqu'à 50% des malades à la phase aiguë d'un infarctus cérébral (Scott et al., 1999). L'association entre l'hyperglycémie à l'admission et la récupération neurologique des patients présentant un infarctus cérébral a été largement étudiée. D'une manière générale, la plupart des études a mis en évidence une augmentation du risque de mauvais pronostic fonctionnel à court et long termes en cas d'hyperglycémie initiale (Capes et al., 2001 ; Hyvärinen et al., 2009 ; Fuentes et al., 2009). Bien que les études ayant évalué l'efficacité des stratégies thérapeutiques visant à réduire la glycémie des patients présentant un infarctus cérébral offrent des résultats décevants (Quinn et Lees, 2009), la prise en charge médicamenteuse de l'hyperglycémie en phase aiguë reste recommandée (European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee, 2008).

- AIT précédent un infarctus cérébral

Plusieurs études épidémiologiques ont démontré que parmi les patients victimes d'un infarctus cérébral, ceux qui avaient un antécédent d'accident ischémique transitoire avaient un pronostic vital et fonctionnel meilleurs (Aboa-Eboulé et al., 2011 ; Béjot et al., 2011b). Cet effet protecteur était particulièrement retrouvé en cas d'AIT récent et de durée courte, et si l'infarctus cérébral n'était pas de type lacunaire. Ainsi, il a été suggéré que l'AIT augmenterait la résistance neuronale à un événement ischémique ultérieur selon des mécanismes de préconditionnement ischémique identifiés chez l'animal (Dirnagl et al., 2009).

b- Marqueurs controversés

▪ Age

La récupération est globalement moins bonne chez les sujets âgés, l'impact négatif de l'âge concernant la vitesse et le niveau final de récupération des patients (Bagg et al., 2002 ; Kugler et al., 2003). Les raisons sont multiples et impliquent à la fois les facteurs environnementaux tels que le niveau de soins administrés à ces patients, les comorbidités associées, et probablement une réduction des capacités de plasticité cérébrale (Shah, 2006). Néanmoins, d'autres études ont réfuté ces constatations (Calmels et al., 2005 ; Luk et al., 2006). Pour certains, l'influence de l'âge est majeure uniquement chez les patients dont le déficit initial est sévère (Black-Schaffer et Winston, 2004).

▪ Volume lésionnel

Le volume lésionnel, mesuré à la phase aiguë par scanner ou IRM, a longtemps été considéré comme négativement corrélé à la récupération fonctionnelle des patients à moyen terme (Saunders et al., 1995 ; Lövblad et al., 1997 ; Tei et al., 2006) et à long terme (Schiemanck et al., 2005). Cependant, ces données ont été remises en causes par d'autres études (Irls 1987 ; Chua et al., 1995 ; Saver et al., 1999). Cette discordance pourrait s'expliquer par l'importance de la localisation de la lésion, paramètre rarement pris en compte dans les études. A titre d'exemple, l'atteinte du cortex moteur primaire dans sa portion moyenne s'accompagne d'un déficit sévère de la main, souvent définitif, alors que les régions plus proximales du membre supérieur auront un potentiel de récupération meilleur du fait d'une convergence de neurones corticospinaux plus importante. De même, concernant les infarctus cérébraux touchant la région capsulo-lenticulaire, le pronostic fonctionnel est meilleur lorsque la lésion épargne une partie du bras postérieur de la capsule interne (Fries et al., 1993).

▪ Pression artérielle

A la phase aiguë d'un infarctus cérébral, environ 75% des patients présentent une pression artérielle systolique supérieure à 140 mmHg (hypertension artérielle réactionnelle). La recherche d'une corrélation entre le niveau de pression artérielle en phase aiguë et la récupération neurologique a donné lieu à des résultats contradictoires. Ainsi, certaines études montrent que la récupération fonctionnelle est négativement corrélée à la pression artérielle (Robinson et al., 2001 ; Boreas et al., 2002) alors que d'autres rapportent l'absence de lien entre ces 2 paramètres (Abboud et al., 2006 ; Jensen et al., 2006). Une étude récente a même mis en évidence le fait qu'une pression artérielle élevée était associée à un pronostic favorable (Yong et al., 2005) alors que certains auteurs ont suggéré que la relation entre le niveau de pression artérielle et le pronostic fonctionnel suivait une courbe en J, avec un pronostic plus sombre pour les patients présentant une valeur aux extrêmes de la pression artérielle (Leonardi-Bee et al., 2002). Une revue systématique n'a pas montré de bénéfice à abaisser la pression artérielle à la phase aiguë d'un infarctus cérébral (Willmot et al., 2004). Les recommandations actuelles indiquent, en dehors des cas de fibrinolyse, qu'il est préférable de respecter l'élévation de la pression artérielle et de ne débiter un traitement qu'en cas de pression artérielle très élevée (pression diastolique >120 mmHg et/ou de pression systolique >220 mmHg), de menace vitale (dysfonction cardiovasculaire, encéphalopathie hypertensive), ou encore d'hypertension intracrânienne majeure liée à l'œdème vasogénique.

c- Taux sanguins des protéines dérivées du cerveau

De nombreuses études ont évalué le lien entre la récupération neurologique post-infarctus cérébral et la concentration sanguine de protéines localisées essentiellement dans le cerveau.

Ainsi, une augmentation de la NSE (Neuron Specific Enolase), une protéine de localisation neuronale mais également retrouvée dans les cellules endocrines, est observée en cas d'infarctus cérébral, et cette augmentation est corrélée au volume de la lésion (Anand et Stead, 2005). En revanche, le lien entre les taux circulants de NSE et la récupération neurologique à moyen et long termes reste très controversé, rappelant ainsi la controverse autour de la relation unissant le volume lésionnel et le devenir neurologique (Anand et Stead, 2005).

L'infarctus cérébral s'accompagne également d'une augmentation de la concentration sérique de S100b, une protéine astrocytaire également retrouvée dans les mélanocytes et les

adipocytes, avec un pic observé au 3ème jour (Dassan et al., 2009). Les taux sériques de S100b semblent corrélés au volume lésionnel et sont plus élevés chez les patients à risque d'infarctus malin et de transformation hémorragique après fibrinolyse. De plus, une corrélation avec le pronostic fonctionnel a été mise en évidence dans plusieurs études (Dassan et al., 2009).

d- Protéines de l'inflammation

L'intérêt du dosage des protéines de l'inflammation pour prédire le devenir neurologique des patients victimes d'un infarctus cérébral a été suscité par des études expérimentales montrant que l'ischémie focale s'accompagne non seulement d'une inflammation locale mais aussi d'une inflammation systémique (Nilupul Perera et al., 2006).

Ainsi, l'infarctus cérébral conduit à une augmentation du taux circulant de la protéine C réactive (CRP) et certaines études ont suggéré que des taux sanguins élevés de CRP à la phase aiguë d'un infarctus cérébral pourraient être associés à un mauvais pronostic fonctionnel (Di Napoli et al., 2005 ; Whiteley et al., 2009). De même, une augmentation de l'interleukine 6 (IL-6) ou encore du fibrinogène accompagne l'infarctus cérébral et serait un marqueur de mauvaise récupération fonctionnelle (Whiteley et al., 2009). Cependant, l'adjonction de ces paramètres à des modèles prédictifs cliniques n'apporte pas de bénéfice supplémentaire pour évaluer le pronostic des patients (Whiteley et al., 2009).

e- Autres marqueurs d'imagerie et de neurophysiologie

Plus récemment, les progrès de l'imagerie cérébrale ont permis d'offrir des outils pronostiques de récupération fonctionnelle supplémentaires, bien qu'actuellement, leur utilisation soit restreinte à la recherche. Ainsi, dans une étude portant sur 20 patients à la phase aiguë d'un infarctus cérébral, une baisse du coefficient de diffusion en IRM au sein du pédoncule cérébral ipsilatéral à la lésion, pouvant correspondre à une dégénérescence wallérienne précoce du tractus cortico-spinal, prédisait fortement le risque de mauvais pronostic fonctionnel à 3 mois (DeVetten et al., 2010). Utilisant une spectroscopie du proton, il a été démontré que chez les patients victimes d'un infarctus cérébral, des taux élevés de N-acétyl aspartate (NAA), composé considéré comme exclusivement neuronal, au sein de la lésion, étaient associés à une meilleure récupération neurologique (Pereira et al., 1999 ;

Lemesle et al., 2000). Enfin, utilisant un protocole de stimulation magnétique transcrânienne répétitive (Theta-burst stimulation intermittente), Di Lazzaro et al (2010) ont démontré que la récupération fonctionnelle à 6 mois des patients présentant un infarctus cérébral était fortement prédite par l'amplitude des potentiels évoqués moteurs dans l'hémisphère ipsilatéral à la lésion.

E- Prise en charge de l'infarctus cérébral à la phase aiguë

L'infarctus cérébral est une urgence thérapeutique nécessitant une prise en charge spécifique au sein d'une filière dédiée et identifiée. De nombreuses études ont démontré l'intérêt d'hospitaliser les patients présentant un infarctus cérébral dans des unités spécialisées appelées unités neurovasculaires (UNV). Ainsi, la prise en charge en UNV des patients permet de réduire d'environ 22% le risque de décès ou de dépendance des patients par rapport à une prise en charge classique avec un effet se maintenant jusqu'à 10 ans après l'évènement, l'effet étant indépendant de l'âge et de la sévérité clinique initiale (Stroke Unit Trialists' Collaboration, 2007).

Ces UNV permettent la mise en place de mesures thérapeutiques adaptées (correction de l'hyperglycémie, de l'hyperthermie, et de la pression artérielle, prévention des troubles de déglutition et des complications infectieuses et thromboemboliques) et la réalisation de la fibrinolyse intraveineuse par rt-PA. Le rt-PA est le seul traitement médicamenteux ayant fait preuve d'efficacité. Ainsi, dans une revue systématique combinant les données individuelles de 6 essais randomisés portant sur un total de 2775 patients, Hacke et al. (2004) ont démontré la supériorité du traitement par rapport au placebo sur le décès ou le handicap à 3 mois lorsque le délai entre la survenue des symptômes et l'injection du rt-PA était inférieur à 4,5 heures. De façon importante, le rt-PA est d'autant plus efficace qu'il est administré de façon précoce. Toutefois, l'étude ECASS-III a rapporté une augmentation significative (+34%) des chances de pronostic favorable à 3 mois chez les patients recevant le rt-PA entre 3 et 4,5 heures après le début des troubles en comparaison avec le placebo (Hacke et al., 2008). Ceci a conduit à recommander la fibrinolyse intraveineuse chez les patients présentant un infarctus cérébral de moins de 4,5 heures (European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee, 2008).

II- Plasticité cérébrale

A- Définition et mécanismes

La plasticité neuronale, terme introduit dans le domaine des Neurosciences en 1906 par le psychiatre italien Ernesto Lugaro, est une caractéristique fondamentale du cerveau. Ce terme signifie que les relations anatomo-fonctionnelles entre neurones ne sont pas figées mais l'objet de perpétuels changements adaptatifs. La plasticité neuronale est nécessaire à la maturation psychique et à l'apprentissage. Elle confère également au cerveau l'aptitude à compenser la perte de fonction induite par une lésion (Witte, 1998). A l'heure actuelle, il est admis que la plasticité post-lésionnelle regroupe un ensemble de mécanismes capables de promouvoir la récupération d'une fonction (Murphy et Corbett, 2009). Celui-ci inclut a) le remodelage anatomique (repousse axonale, arborisation dendritique, synaptogénèse), et fonctionnel (efficacité des synapses) des réseaux neuronaux ; b) le démasquage de circuits neuronaux pré-existants mais qui jusque-là n'étaient pas fonctionnels ; c) la neurogénèse.

B- Méthodes d'études

1- Pré-mortem

Différentes techniques sont utilisables pour mettre en évidence en pré-mortem une plasticité post-lésionnelle, du moins sa composante fonctionnelle. Les techniques très utilisées chez l'Homme commencent à être utilisées chez l'animal. Cependant, chez ce dernier, l'anesthésie est obligatoire et constitue un biais dans l'interprétation des résultats.

a- Imagerie cérébrale

L'imagerie regroupe l'IRM fonctionnelle (IRMf), la tomographie par émission de positons (TEP) et la spectroscopie proche infrarouge (NIRS : Near-Infrared Spectroscopy) (Carey et Steitz, 2007 ; Lin et al., 2009). Ces techniques mesurent la réponse hémodynamique à des variations de l'activité synaptique. Pour l'étude du système moteur, le sujet effectue un

mouvement (état 1, le plus souvent mouvement des doigts) en alternance avec un repos complet (état 2). L'objectif de l'analyse statistique est alors de déterminer les régions cérébrales dans lesquelles le mouvement modifie de façon significative le signal. Concernant l'IRMf par méthode BOLD (Blood Oxygen Level Dependent Contrast), la technique permet une mesure très indirecte du débit sanguin. Ainsi, lors de l'activation neuronale, il existe localement une hyperoxygénation entraînant une diminution temporaire de la concentration en désoxyhémoglobine dans le lit capillaire. Ce phénomène conduit à une modification du signal $T2^*$ qui est proportionnel à la perfusion cérébrale. L'analyse des images peut être traitée selon 2 approches : soit une étude avec analyse de groupe avec visualisation des résultats sur un cerveau moyen normalisé, soit une étude individuelle patient par patient, avec visualisation des résultats sur le cerveau de chaque patient. La TEP permet de visualiser la distribution de l'oxygène marqué, qui est un reflet du débit sanguin régional et donc de l'activité neuronale. Cependant, comme l'IRMf, elle nécessite de placer le sujet dans une machine limitant ainsi les tâches motrices réalisées. La NIRS est une technique non invasive. Elle repose sur le fait que le tissu cérébral est transparent à la lumière dans la gamme du proche infrarouge (entre 700 et 900 nm) alors que la molécule d'hémoglobine au sein des vaisseaux est un chromophore qui réfléchit la lumière dans cette gamme et son spectre d'absorption est différent selon qu'elle transporte ou pas une molécule de dioxygène (oxyhémoglobine versus désoxyhémoglobine). L'augmentation d'activité neuronale induit une augmentation du débit sanguin local et donc une modification du rapport oxy/désoxyhémoglobine présente sur le chemin optique des photons qui traversent la région du cerveau considérée. En mesurant, les changements du signal liés à l'absorption et à la diffusion, il est donc possible de déterminer si les régions observées sont actives ou non (Lin et al., 2009). L'avantage principal de la NIRS est sa portabilité, autorisant son utilisation en ambulatoire ce qui permet la réalisation de tâches motrices plus complexes.

Enfin, il existe actuellement un intérêt grandissant pour l'utilisation de l'IRM pour visualiser le remodelage vasculaire et le remodelage axonal induits par l'infarctus cérébral (Jiang et al., 2010).

b- Electrophysiologie

Les techniques d'électrophysiologie incluent l'électro-encéphalographie haute résolution (EEG), peu utilisée dans l'étude de la plasticité post-lésionnelle, la magnéto-encéphalographie (MEG) et la stimulation magnétique trans-crânienne (SMT).

La MEG permet la détection à la surface de la boîte crânienne du champ magnétique généré par les courants post-synaptiques associés à l'activation neuronale synchrone d'une région cérébrale (Maclin et al., 1994). Elle offre la possibilité d'identifier les régions cérébrales dédiées à la représentation sensitivo-motrice de la main selon une organisation somatotopique. Basée sur le fait que cette organisation est symétrique chez les sujets sains (Tecchio et al., 1997), la MEG permet, par comparaison de l'hémisphère ipsilatéral et contralatéral à l'infarctus, d'identifier les phénomènes de réorganisation au sein des structures lésées.

La SMT a pris ces dernières années une place importante dans le champ d'étude de la plasticité post-lésionnelle. Elle repose sur le passage d'un courant intense et bref dans une bobine conductrice ayant pour effet l'induction locale d'un champ électromagnétique (Hallett, 2007). Appliqué sur le scalp en regard de l'aire motrice primaire, le champ magnétique active les cellules pyramidales du faisceau corticospinal. Il devient alors possible d'étudier l'excitabilité neuronale et la conduction des voies motrices par l'enregistrement électromyographique de potentiels évoqués moteurs (PEM). Ainsi, en stimulant le cortex moteur primaire en plusieurs endroits et en enregistrant la réponse évoquée du muscle cible, une véritable cartographie de la représentation motrice de ce muscle peut être réalisée (Wassermann et al., 1992). La taille de cette représentation et l'amplitude des PEM dépendent de l'intensité de la stimulation magnétique, de l'excitabilité et du nombre de neurones recrutés, et de l'intégrité de l'ensemble du faisceau cortico-spinal (Bütefisch et al., 2006). Il est ainsi possible d'évaluer par cette technique SMT la récupération fonctionnelle après un infarctus cérébral, et ses mécanismes. De plus, la SMT double choc offre la possibilité unique d'étudier phénomènes d'inhibition et de facilitation des réseaux neuronaux corticaux impliqués dans la réorganisation cérébrale post-lésionnelle. En outre, lorsque la SMT est combinée à une thérapie favorisant ou inhibant les réponses obtenues, les neuromédiateurs à l'origine des effets observés peuvent être identifiés. Enfin, la SMT répétitive (SMTr) est une technique qui permet de moduler de manière artificielle, transitoire et réversible l'efficacité du réseau neuronal sous-jacent, autorisant ainsi de vérifier le rôle spécifique d'une région corticale dans la réalisation d'une tâche spécifique (Rossi et al., 2001).

2- Post-mortem

Les changements plastiques d'ordre morphologique nécessitent une étude post-mortem du cerveau. Les techniques de microscopie électronique permettent l'étude de l'arborisation dendritique. L'immunomarquage de certaines protéines permet d'apprécier de manière indirecte la repousse axonale (protéine GAP-43, spécifique des cônes de croissance des axones), et le nombre de synapses (synaptophysine, protéine contenue dans les vésicules pré-synaptiques) (Stroemer et al., 1998).

L'étude de la neurogénèse repose quant à elle sur la mise en évidence de neurones nouvellement formés. Une technique immunohistochimique largement répandue utilise le bromodésoxyuridine (BrDU), un analogue des bases T de l'ADN, qui s'incorpore dans les cellules en division. Ainsi, la détection sur des coupes de cerveau du BrDU, administré préalablement à l'animal, dans des cellules exprimant par ailleurs des marqueurs spécifiques des neurones (Neu-N, Map-2 ou encore β -tubulin III) permet de visualiser les nouveaux neurones formés (Nowakowski et al., 1989).

C- Plasticité et récupération fonctionnelle post-AVC

Après un infarctus cérébral, la majorité des patients s'améliore sur le plan fonctionnel de façon spontanée. Outre la levée du diaschisis (Baron et al., 1981 ; Kataoka et al., 1989 ; Seitz et al., 1999 ; Finger et al., 2004) et la résorption de l'œdème vasogénique, la plasticité post-lésionnelle est maintenant largement impliquée dans la récupération. La plupart des études cliniques s'accorde à montrer que le niveau maximal de la récupération qu'elle soit motrice, sensitive, cognitive ou en relation avec la parole est atteint dans les 3 à 6 mois. Un point important est que ce niveau maximal est atteint d'autant plus précocement que l'AVC est peu sévère (Jorgensen et al., 1995 ; Paolucci et al., 2000). Cependant, des données plus récentes ont montré qu'il est encore possible de réduire le déficit fonctionnel avec des stratégies débutées au delà de 3 mois voire des années après les premiers signes cliniques (Carraugh et al., 2011).

1- Récupération spontanée

Dans la majorité des études, le focus s'est fait sur la récupération de la fonction motrice, notamment de la main, chez les patients hémiparétiques (Schaechter, 2004 pour revue). Les études longitudinales conduites en imagerie et SMT ont révélé que l'excitabilité du cortex moteur était plus élevée du côté lésé que du côté non lésé (Cramer et al., 1997 ; Liepert et al., 2000a) et que la réduction de l'hyperexcitabilité périlésionnelle précédait l'amélioration de la fonction motrice d'où l'idée selon laquelle la normalisation de latéralité de l'activation du cortex moteur était liée à une bonne récupération motrice (Ward, 2004 ; Johansson, 2011 pour revues). Cependant, certaines études ont suggéré que cette normalisation était en fait le reflet d'une préservation de l'intégrité du cortex moteur. Quoiqu'il en soit, on considère que l'amélioration fonctionnelle post-AVC est à relier au remodelage des aires corticales motrices périlésionnelles, même si la contribution de l'hémisphère controlatéral n'est pas nulle.

2- Récupération induite

a- Thérapie par le mouvement

Actuellement, tous les patients victimes d'un AVC ischémique bénéficient d'une rééducation motrice standard (passive et active) dont l'efficacité est connue depuis de nombreuses années (Ottenbacher et Jannet, 1993) et est d'autant plus grande que la rééducation est débutée précocement (Paolucci et al, 2000), bien que des données récentes ont mis en évidence un effet bénéfique d'une rééducation même débutée tardivement (Carraugh et al., 2011). A l'heure actuelle, il n'existe pas de recommandation sur le choix des techniques rééducatives à utiliser.

A côté de la kinésithérapie de base, différentes stratégies ont fait preuve de leur efficacité. Parmi celles-ci, l'utilisation forcée du membre parétique a été très étudiée aussi bien chez l'animal (Biernaskie et Corbett, 2001) que chez l'homme (Wolf et al., 2007 ; Wolf et al., 2008). Cette technique consiste à « contraindre » le membre supérieur sain pour forcer l'utilisation du membre parétique, ce qui revient à désactiver l'aire motrice primaire correspondante (controlatérale à l'infarctus), limitant ainsi son action transcalleuse inhibitrice et délétère sur l'hémisphère ischémié. La SMT a révélé que cette stratégie conduisait à une extension de la représentation corticale du membre vers les régions adjacentes et à une

normalisation de la balance d'excitabilité corticale entre les 2 hémisphères (Liepert et al., 1998 ; Liepert et al., 2000b). L'utilisation forcée du membre parétique peut faire appel à des robots (Kwakkel et al., 2008). Par ailleurs, certaines données récentes suggèrent que trop intense, cette thérapie peut avoir un effet délétère quand elle est débutée précocement (Dromerick et al., 2009). D'autres techniques ont été développées pour améliorer la fonction du membre parétique comme l'entraînement bimanuel (Lin et al., 2010) ou encore l'entraînement avec un miroir (Dohle et al., 2009 ; Yavuzer et al., 2008). Dans cette technique, un miroir est placé entre les membres supérieurs du patient, face réfléchissante côté de la main saine. Le membre atteint est caché derrière le miroir. Le patient a ainsi la sensation d'observer non seulement les mouvements du membre sain, mais également leur reflet dans le miroir, comme si son membre lésé bougeait. Des études, en nombre très limité, ont utilisé avec succès la réalité virtuelle (Henderson et al., 2007), l'imagerie motrice (imagination de l'action) (Page et al., 2007) et même l'observation par le malade d'un mouvement qu'il est incapable de réaliser (Ertelt et al., 2007). Cette dernière technique met en jeu les neurones miroirs, neurones qui s'activent aussi bien lors de la réalisation d'une tâche motrice déterminée que lors de l'observation de cette même tâche (Rizzolatti et Craighero, 2004).

Le patient victime d'un AVC présente souvent un déficit de la locomotion qui pourrait être pris en charge par la marche sur tapis roulant avec ou sans harnais. Les résultats obtenus sont mitigés, certaines études montrant un bénéfice (Macko et al., 2005) et les autres aucun effet (Moseley et al., 2005). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par la différence existant entre les protocoles testés (nombre de séances hebdomadaires, durée de la séance, début du traitement par rapport aux premiers signes cliniques). De façon importante, certaines données suggèrent que le tapis roulant pourrait exercer un effet positif sur le déficit cognitif associé à l'AVC (Kluding et al., 2011).

b- Thérapie de neurostimulations

La SMT est susceptible de modifier durablement l'excitabilité corticale cérébrale. L'effet obtenu dépend de la fréquence de stimulation utilisée : une stimulation haute fréquence (> 5 Hz) augmente l'excitabilité corticale alors qu'une stimulation basse fréquence (< 1 Hz) la diminue (Hallett, 2007). Ainsi, à partir de ces constatations, deux approches thérapeutiques ont été envisagées chez les patients souffrant d'un infarctus cérébral. La première consiste à stimuler l'excitabilité corticale de l'hémisphère lésé par utilisation d'un SMT à haute

fréquence (Khedr et al., 2005). La seconde vise à réduire l'excitabilité corticale de l'hémisphère sain de manière à limiter son effet inhibiteur sur l'hémisphère atteint (Mansur et al., 2005 ; Takeuchi et al., 2005 ; Fregni et al., 2006). Les études ont démontré que l'application de ces procédures s'accompagnait d'une amélioration fonctionnelle (Khedr et al., 2005 ; Mansur et al., 2005 ; Takeuchi et al., 2005 ; Fregni et al., 2006) et que le bénéfice se maintenait pendant un an (Khedr et al., 2010). D'autres techniques telles que la stimulation cérébrale transcrânienne directe à courant continu ou la stimulation nerveuse périphérique de la main parétique semblent également présenter un intérêt surtout si elles sont appliquées simultanément (Celnik et al., 2009)

c- Thérapie médicamenteuse

L'approche pharmacologique de la stimulation de la plasticité post-lésionnelle a été abordée dans de nombreux travaux. L'espoir d'identifier des traitements médicamenteux capables d'améliorer le pronostic moteur des patients a été suscité dès le début des années 80 par les résultats de plusieurs études animales ayant mis en évidence un effet bénéfique des amphétamines sur la récupération post-lésionnelle. Ainsi, il avait été démontré que l'administration d'une dose unique d'amphétamine 24 heures après la réalisation d'une ablation unilatérale du cortex sensitivomoteur chez le rat s'accompagnait d'une amélioration durable de la motricité des animaux (Feeney et al., 1982). Cet effet bénéfique était bloqué par l'administration subséquente d'halopéridol. De plus, ce dernier, administré de manière isolé, réduisait la récupération motrice des rats. Par la suite, l'effet des amphétamines sur la récupération fonctionnelle a été confirmé dans d'autres modèles de lésion dont l'ischémie cérébrale (Stroemer et al., 1998 ; Adkins et Jones, 2005 ; Gilmour et al., 2005 ; Papadopoulos et al., 2009). La constatation d'un effet rapide après administration d'amphétamine a conduit à penser que cette molécule pouvait faciliter la récupération motrice via un effet sur la levée du phénomène de diaschisis, d'autant plus que les amphétamines peuvent induire des changements régionaux dans la circulation sanguine cérébrale (Mathew et Wilson, 1985). Une autre hypothèse repose sur le fait que l'effet des amphétamines semble dépendant des conditions dans lesquelles les animaux sont pris en charge au moment de son administration. Ainsi, l'administration d'amphétamine apparaissait efficace chez les animaux bénéficiant de manière concomitante d'une stimulation de l'activité motrice ou des fonctions comportementales (Stroemer et al., 1998 ; Papadopoulos et al., 2009). De ce fait, la molécule

pourrait agir en favorisant les processus de réapprentissage, notamment la potentialisation à long terme (LTP) traduisant un phénomène de plasticité à l'échelon synaptique. Enfin, plus récemment, plusieurs études ont mis en évidence le fait que la récupération fonctionnelle motrice et comportementale des animaux traités par amphétamine après induction d'un infarctus cérébral s'accompagnait d'une repousse axonale et d'une synaptogénèse dans le cortex ipsilésionnel et controlatéral, ainsi qu'au niveau des voies de projection descendantes du cortex controlatéral à la lésion (Stroemer et al., 1998 ; Papadopoulos et al., 2009).

Suite à ces résultats obtenus chez l'animal, l'effet des amphétamines sur la récupération motrice après un infarctus cérébral a été testé chez l'Homme, avec des résultats contradictoires. Ainsi, une récente revue de la littérature avec méta-analyse ne permet pas de tirer de conclusion définitive (Martinsson et al., 2007). En effet, dans ce travail, à partir de 8 études incluant 226 malades, aucune différence significative concernant les performances motrices des patients, mesurées à l'issue du suivi par différentes échelles cliniques, n'était mise en évidence entre le groupe traité par amphétamine et le groupe placebo. Néanmoins, basé sur 6 études incluant 176 patients, les auteurs ont mis en évidence une discrète amélioration de la fonction motrice, exprimée cette fois-ci en changement relatif du score moteur entre l'inclusion et la fin du suivi, chez les patients traités. Cependant, le faible nombre de patients inclus, les divergences concernant les caractéristiques de base et les méthodes d'évaluation utilisées rendent l'interprétation de ces résultats délicate.

Dans les suites, plusieurs autres molécules ont été testées, avec des résultats également le plus souvent mitigés (Liepert, 2008 pour revue).

Parmi les molécules utilisées, les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (IRSS) pourraient présenter un intérêt particulier. Ainsi, dans une étude portant sur 52 patients inclus 1 à 6 mois après un infarctus cérébral sévère laissant pour séquelle une incapacité à marcher, l'administration quotidienne sur une période de 3 mois de fluoxétine, associée à un programme de rééducation, était associée à une meilleure récupération fonctionnelle en termes d'amélioration de la marche et d'activités de la vie quotidienne comparée à un traitement placebo ou un traitement par maprotiline, un antidépresseur tricyclique (Dam et al., 1996). Dans une étude incluant 8 patients présentant un infarctus cérébral profond lacunaire responsable d'une hémiparésie pure, Pariente et al. (2001) ont démontré qu'une dose unique de 20 mg de fluoxétine améliorait la fonction motrice de la main et s'associait à une sur-activation du cortex moteur ipsilésionnel en IRMf lors de la réalisation d'une tâche de flexion

et extension des doigts, en faveur de l'effet du traitement sur le remodelage post-lésionnel. Une étude a également démontré que l'administration d'une dose unique de 40 mg de citalopram chez 8 patients présentant des séquelles d'infarctus cérébral s'accompagnait d'une amélioration de la dextérité de la main parétique (Zittel et al., 2008). Plus récemment, l'administration quotidienne pendant 1 mois de citalopram associée à un programme de rééducation chez des patients ayant présenté un infarctus cérébral était associé à une réduction de l'excitabilité corticale de l'hémisphère controlatéral à la lésion, mesurée par SMT, comparé aux patients recevant un placebo (Acler et al., 2009).

Les mécanismes sous-tendant l'effet des IRSS sur la modulation de la plasticité post-lésionnelle restent néanmoins hypothétiques. Ainsi, les expérimentations conduites chez l'animal ont démontré que l'administration de fluoxétine s'accompagnait d'une augmentation des taux cérébraux de sérotonine (Felton et al., 2003) et favorisait la neurogénèse (Malberg et al., 2000). D'autres études ont suggéré que les effets de la fluoxétine sur la plasticité post-lésionnelle pourrait être liée à une augmentation de la synthèse de facteurs neurotrophiques incluant le Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) (Russo-Neustadt et al., 1999 ; Coppel et al., 2003). Cependant, ces données restent controversées car certaines études animales n'ont pas mis en évidence d'effet bénéfique d'un traitement par fluoxétine sur la récupération fonctionnelle (Windle et Corbett, 2005).

III- Le Brain-Derived Neurotrophic Factor

Le BDNF appartient à la famille des neurotrophines qui comprend également, chez les mammifères, le nerve growth factor (NGF), premier facteur neurotrophique identifié, et les neurotrophines 3 (NT3) 4 (NT4). Le BDNF a été purifié pour la première fois par Barde et al (1982) à partir du cerveau de cochon. Dans le même travail, les auteurs montraient que le BDNF augmente la survie de neurones sensitifs en culture et que cet effet du BDNF n'est pas bloqué par l'addition d'anticorps anti-NGF dans le milieu de culture. Le gène *bdnf* a été cartographié sur le chromosome 11 chez l'humain, sur le chromosome 2 chez la souris et sur le chromosome 3 chez le rat (Ozcelik et al., 1991). Les souris génétiquement invalidées pour le gène *bdnf* (-/-) ne sont pas viables. En revanche les souris invalidées hétérozygotes (+/-) pour le BDNF sont viables et présentent la particularité d'être obèses (hyperphagie). Chez

l'Homme, le gène du BDNF est le siège d'un polymorphisme fonctionnel affectant un seul nucléotide au sein du codon 66, aboutissant *in fine* au remplacement de la Valine (Val) par une Méthionine (Met) et à une altération de la sécrétion du BDNF. Au sein de la population Caucasienne, 20 à 30 % des individus sont hétérozygotes Val/Met et 4 % sont homozygotes Met/Met.

A- BDNF cérébral

1- Répartition et localisation cellulaire du BDNF dans l'organisme

La première étude de répartition du BDNF (la protéine) dans l'organisme a été réalisée chez le rat à la fin des années 90 (Kato-Semba et al., 1997). Elle montre, chez le rat âgé de 30 jours, que le BDNF est présent dans les bulbes olfactifs, le cervelet, le cerveau et que les structures cérébrales les plus riches en BDNF sont l'hippocampe et l'hypothalamus. Elle rapporte également la présence de BDNF dans le thymus, le foie et la rate mais à des concentrations 10 fois moindres que les concentrations hippocampiques, et signale enfin que le BDNF n'a pas pu être détecté dans le cœur, le pancréas, les reins et les muscles. Un autre résultat important de cette étude pionnière est que les concentrations de BDNF augmentent de la naissance jusqu'à l'âge de 30 jours, au delà les taux se stabilisent, continuent à augmenter ou diminuent selon la structure considérée. De façon importante, le vieillissement (chez le rat) ne semble pas affecter les taux cérébraux du BDNF (Croll et al., 1998). Les techniques d'immunomarquage réalisées sur coupes de cerveau révèlent la présence de la protéine BDNF dans les neurones exclusivement, au niveau du soma (noyau inclus) et des neurites (Kawamoto et al., 1996). L'ensemble de ces données a été par la suite confirmé même si l'amélioration des techniques de détection du BDNF a permis de mettre en évidence de faibles concentrations de BDNF pratiquement dans tous les organes (cœur, vaisseaux, poumons ...) ainsi que dans le sang (cf III.B).

2- Synthèse et sécrétion

La synthèse neuronale du BDNF est bien documentée et a fait l'objet de revues récentes (Lessmann et al., 2003, 2009, Greenberg et al., 2009). Comme toutes les

neurotrophines, le BDNF est un peptide. Aussi, il est synthétisé sous forme d'un précurseur de haut poids moléculaire (pré-proBDNF) qui sera successivement clivé en pro-BDNF (34-kDa) et BDNF mature (mBDNF) (14-kDa) (Figure 1). De façon plus détaillée, l'ARN messager codant le BDNF est traduit par le réticulum endoplasmique rugueux en pré-pro-BDNF. Celui-ci est adressé au réticulum endoplasmique lisse et donne le pro-BDNF après clivage du peptide signal. Le pro-BDNF passe dans l'appareil de Golgi où finalement il s'accumule dans les vésicules du réseau *trans* golgien. Le clivage du pro-BDNF en mBDNF a lieu soit dans les vésicules du *trans* golgien et met en jeu la furine (endoprotéase membranaire) soit plus tard dans les vésicules de sécrétion et met alors en jeu la pro-protéine convertase PC1/3. La sécrétion des vésicules est soit constitutive (permanente mais non régulée), soit régulée par la concentration cytosolique en calcium, la première modalité ayant lieu essentiellement au niveau du soma et la seconde au niveau des neurites (dendrites et terminaison axonale) (Brigadski et al., 2005) (Figure 2). Des données plus récentes (Lu et al., 2005 pour revue, Yang et al., 2009) mais encore discutées (Matsumoto et al., 2008) suggèrent que les neurones peuvent également sécréter du pro-BDNF. Une fois dans l'espace extracellulaire, le pro-BDNF serait transformé en mBDNF par les métalloprotéases matricielles MMP 3 et MMP7 et surtout par la plasmine (Lee et al., 2001 ; Pang et al., 2004). Il est important d'indiquer que les neurones secrètent du plasminogène inactif et son activateur le t-PA (activateur tissulaire du plasminogène) dont la source cellulaire la plus anciennement connue est la cellule endothéliale (Plow et al., 1995). Il a même été montré que la sécrétion de t-PA était proportionnelle à l'activité neuronale (Gualandris et al., 1996, Nagappan et al., 2009) et que le BDNF induisait la synthèse neuronale du t-PA (Fiumelli et al., 1999).

Le polymorphisme Val66-Met est localisé dans la séquence codant le pro-BDNF. Il n'est pas associé à une modification du ratio pro-BDNF/mBDNF mais perturbe le transport, la distribution cellulaire et la sécrétion du mBDNF.

pré	Pro	BDNF.....
1...18	18.....131	131..... 249

Figure 1 : Représentation schématique de la structure de la protéine BDNF. Le pré-pro-BDNF (249 acides aminés) est successivement scindé en pro-BDNF et BDNF mature.

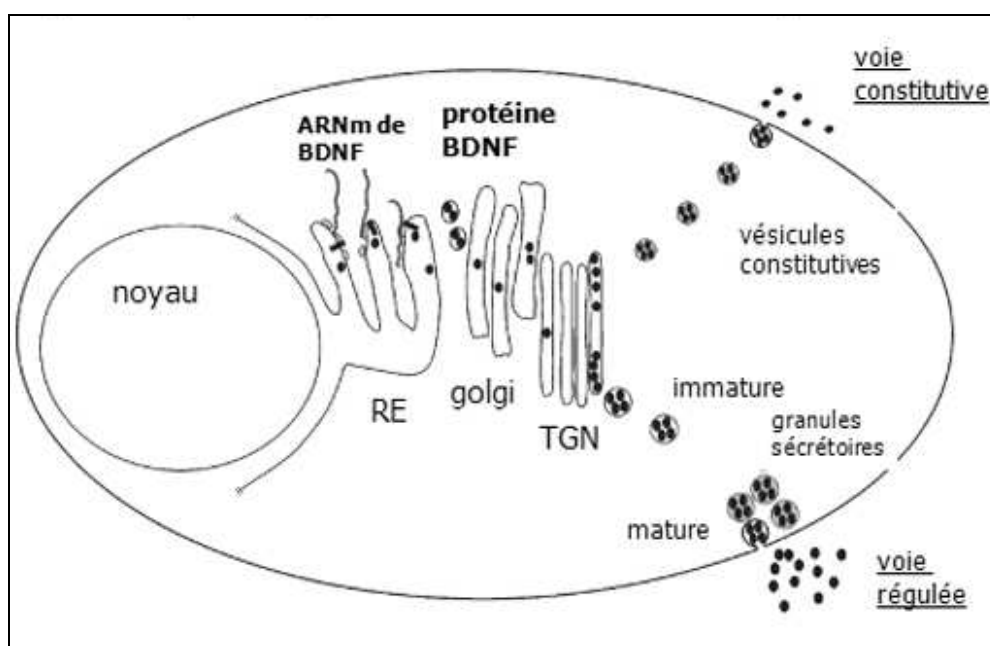


Figure 2 : De la synthèse à la sécrétion du BDNF. L'ARNm du BDNF est transporté des ribosomes au réticulum endoplasmique (RE) et la pré-pro-protéine est alors séquestrée dans le RE. Le BDNF atteint l'appareil de Golgi, puis le réseau Trans-Golgien (TGN); il est ensuite accumulé dans des vésicules. Des convertases présentes dans le TGN peuvent alors cliver le pro-BDNF en BDNF mature qui sera libéré selon la voie constitutive. Alternativement, le pro-BDNF peut quitter le TGN dans des granules de sécrétion immatures qui contiennent un type différent de convertases. Le BDNF mature pourra alors être produit dans les granules de sécrétion en route vers la membrane plasmique et donner des granules de sécrétion matures. Ces derniers seront sécrétés en réponse à une augmentation de la concentration cytosolique en calcium (voie régulée). Modifié d'après Lessmann *et al.* (2003).

Un certain nombre de travaux ont été consacrés à la régulation de la synthèse du BDNF. D'une façon générale, dans le SNC, l'expression des ARNm du BDNF augmente après application d'interventions qui stimulent l'activité neuronale. Ainsi, les études *in vitro* et *in*

vivo s'accordent à montrer que le glutamate favorise la synthèse du BDNF alors que le GABA l'inhibe (Zafra et al., 1990 ; Zafra et al., 1991). Outre le glutamate, d'autres neuromédiateurs se sont révélés capables d'augmenter les taux d'ARNm codant le BDNF. On peut citer l'acétylcholine (Lindefors et al., 1992), la dopamine (Küppers et Beyer, 2001) et la sérotonine (Vaidya et al., 1997). La synthèse du BDNF est également sensible aux hormones stéroïdes qu'elles soient circulantes ou produites localement dont les œstrogènes, la progestérone, la testostérone ou encore les glucocorticoïdes (Tapia-Arancibia et al., 2004 ; Begliuomini et al., 2008). A l'étage moléculaire, l'induction de *bdnf* est largement contrôlée par le facteur de transcription CREB (AMPC-calcium response element binding protein). Concernant la sécrétion neuronale du BDNF, le principal facteur de contrôle est l'activité neuronale elle-même. En effet, plus l'activité neuronale augmente, plus la concentration cytosolique en calcium s'élève (influx de calcium via les canaux calciques dépendants du potentiel et les récepteurs ionotropiques au glutamate, sortie du calcium hors du réticulum sarcoplasmique) et plus importante est la sécrétion vésiculaire (au niveau des dendrites et des terminaisons axonales). Par ailleurs, l'activité neuronale régule le transport des ARNm du BDNF et de la protéine vers les dendrites (Tongiorgi, 2008).

3- Transport axonal

A l'intérieur du neurone, le BDNF vésiculaire est l'objet de 2 types de transport : rétrograde (de la terminaison axonale au soma) et antérograde (du soma à la terminaison axonale).

Le BDNF a été initialement identifié comme un facteur synthétisé par l'effecteur des neurones et capable de réguler la différenciation et la survie des neurones innervant le dit effecteur, cette fonction nécessitant l'existence d'un transport rétrograde à l'intérieur du neurone. On sait maintenant que le BDNF est également synthétisé et sécrété par les neurones et capable d'exercer des effets pré et post-synaptiques, fonction nécessitant cette fois-ci le transport antérograde du BDNF (Figure 3).

Le transport rétrograde concerne l'endocytose du BDNF extracellulaire. Ce phénomène a été largement impliqué, lors du développement in utero, dans la survie et la croissance axonale en direction des effecteurs des neurones sympathiques. Les cellules cibles (épithéliales, musculaires) sécrètent du BDNF en faible quantité. Celui-ci se fixe sur les récepteurs TrKB portés par les terminaisons sympathiques. Le complexe récepteur-BDNF est

ensuite internalisé (phénomène d'endocytose médiée par un récepteur) et les vésicules d'endocytose sont transportées jusqu'au soma. Le récepteur qui est actif (tyrosine kinase activée et récepteur phosphorylé) déclenche la transcription des gènes impliqués dans la survie neuronale. Dans ces conditions, seuls survivront les neurones sympathiques exprimant les récepteurs au BDNF. On sait maintenant que le transport rétrograde s'observe également dans le système nerveux central adulte, l'origine du BDNF extracellulaire étant alors un autre neurone. Les mécanismes intimes sont décrits dans la revue de Heerssen et Segal (2002).

Le transport antérograde concerne quant à lui le BDNF synthétisé par le neurone lui-même. Celui-ci est transporté vers la terminaison axonale d'où il est sécrété (selon un processus constitutif ou régulé) avant d'exercer ses effets qui seront autocrines ou paracrines selon la localisation (pré ou post-synaptique) des récepteurs au BDNF.

Ces données permettent de comprendre pourquoi la détection du BDNF dans une cellule donnée ne signifie pas que le BDNF a été synthétisé par cette cellule, seule la présence conjointe d'ARNm permet de l'affirmer.

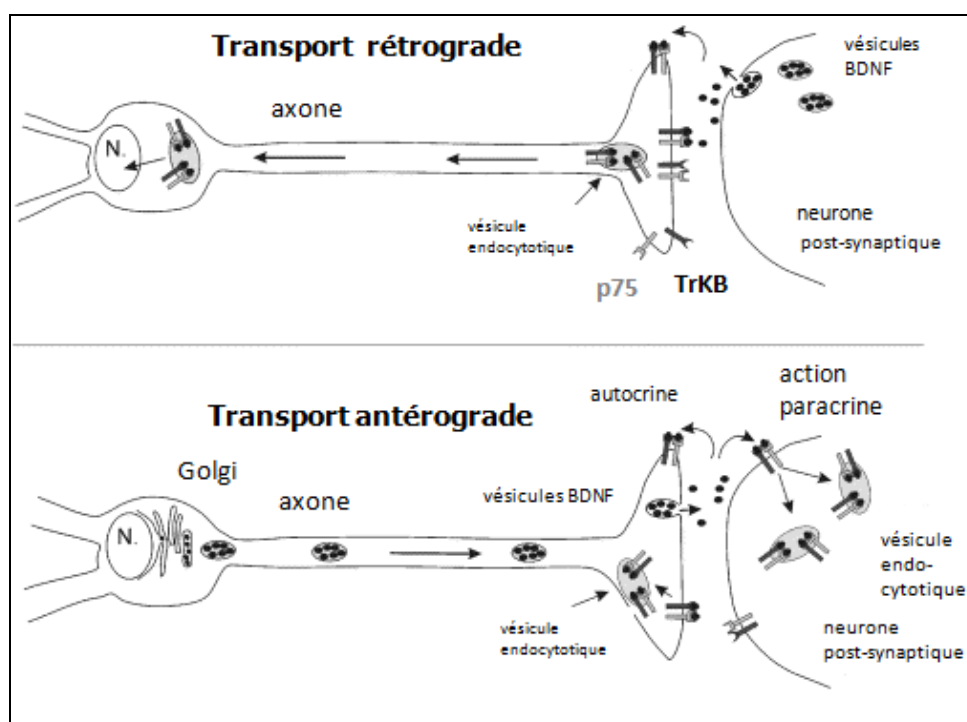


Figure 3 : Transport antérograde et rétrograde du BDNF. *En haut* : selon la vue classique, le BDNF est sécrété par la cellule cible innervée (par la voie de sécrétion constitutive ou régulée), se lie à son récepteur et est ensuite accumulé dans une vésicule d'endocytose avec son récepteur. Après le transport rétrograde de la vésicule endocytotique (appelé « endosome de signalisation »), le complexe BDNF/récepteur commence la signalisation dans le soma de la cellule, en plus des processus de signalisation au niveau des terminaisons axonales. *En bas* :

Les vésicules contenant du BDNF peuvent aussi être transportées du soma de la cellule aux terminaisons axonales des neurones à BDNF. A la suite d'une sécrétion présynaptique, le BDNF peut avoir une action autocrine ou paracrine, selon le site d'expression du récepteur TrkB. Les endosomes de signalisation (vésicules endocytotiques) peuvent donc être générés dans des compartiments pré- ou post-synaptiques. Un transport antérograde n'exclut pas la possibilité d'un transport rétrograde dans le même neurone. Modifié d'après Lessmann *et al.* (2003).

4- Récepteurs du BDNF

Il existe 2 types de récepteurs au BDNF qui sont le récepteur TrkB (tropomyosin-related kinase receptor type B) et le récepteur p75^{NTR} (pan-neurotrophine receptor). Le BDNFm est bien plus affine pour le récepteur TrkB que pour le récepteur p75^{NTR}. Par ailleurs, alors que TrkB est spécifique du BDNF, p75^{NTR} peut être activé par toutes les neurotrophines (d'où son nom). Il a été récemment montré que le pro-BDNF était fortement affine pour les récepteurs p75^{NTR} et faiblement affine pour les récepteurs TrkB. Nous verrons plus loin que l'activation des récepteurs TrkB et p75^{NTR} ont des effets opposés mettant en lumière l'importance de pouvoir faire un dosage séparé de la forme mature du BDNF (BDNFm) et de son précurseur (pro-BDNF). Cette possibilité technique est relativement récente, expliquant pourquoi la répartition tissulaire de chacune des formes comme l'effet de l'âge sur leur taux ne sont pas encore décrites dans la littérature.

Les récepteurs TrkB et p75^{NTR} sont tous deux des récepteurs à activité tyrosine kinase (Huang et Reichardt, 2003). Pour le récepteur TrkB, les voies majeures de signalisation sont celles de la PI-3 kinase, de ERK et de la phospholipase C, qui conduisent à la phosphorylation et l'activation du facteur de transcription CREB qui induit la transcription de nombreux gènes (Figure 4). Il a été également montré que l'activation de TrkB modulait ou activait un certain nombre de canaux ioniques et conduisait ainsi à un changement rapide du potentiel de membrane. Ainsi, les neurones émettent des potentiels d'action lorsqu'ils sont exposés à de faibles concentrations de BDNF (Kafitz et al., 1999). Pour le récepteur p75^{NTR}, il est couplé à la cascade des Jun kinases et de NF-KB. En fait, il existe 2 types de récepteurs TrkB : les récepteurs complets ou « full length » (TrkB.FL) possédant un domaine tyrosine kinase et les récepteurs incomplets ou tronqués (« truncated ») dépourvus de domaine tyrosine kinase et dont il existe 2 formes TrkB.T1 et TrkB.T2. Les récepteurs TrkB-FL et TrkB.T2 coexistent sur un même neurone aux étages pré- et post-synaptique tandis que les récepteurs TrkB.T1 sont présents sur les cellules gliales. Il a été suggéré (Haapasalo et al., 2002) que les

récepteurs tronqués pourraient jouer le rôle de récepteur de clairance (internalisation du BDNF présent dans l'espace extracellulaire, cf transport rétrograde)

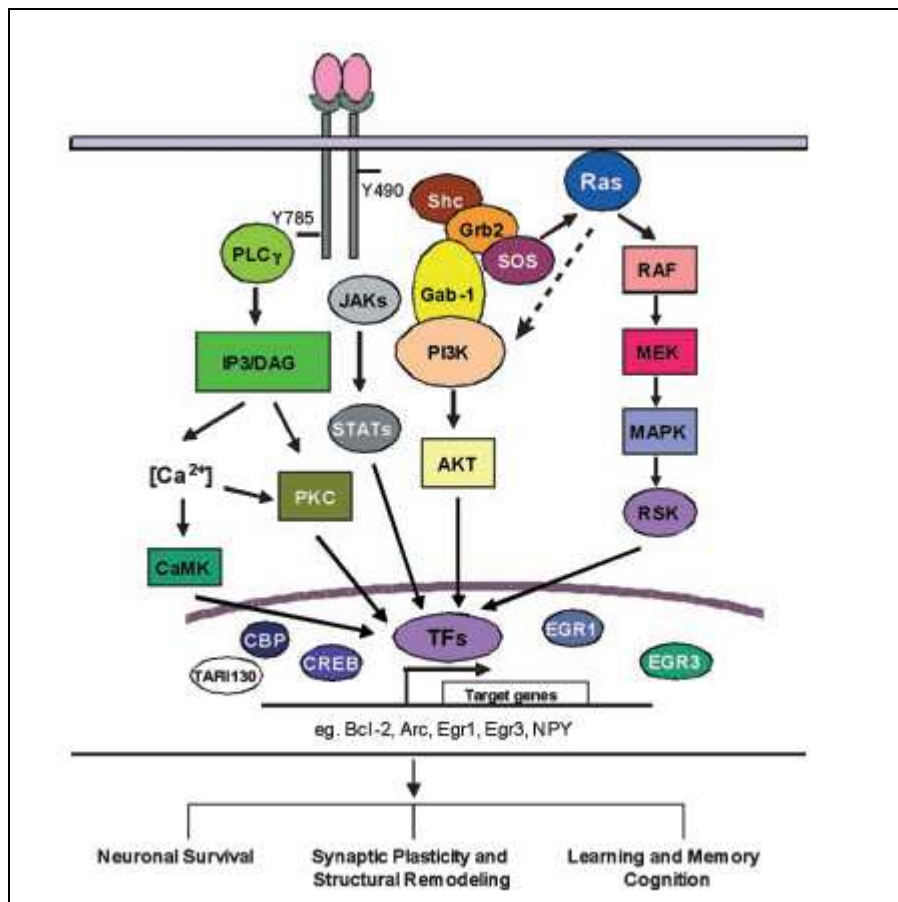


Figure 4 : Voies de signalisation médiées par le récepteur TrkB. La fixation du BDNF sur le récepteur TrkB entraîne une dimérisation du récepteur et une auto-phosphorylation trans des résidus tyrosines spécifiques, créant ainsi des sites de fixation pour les molécules de signalisation telles que Shc et la phospholipase C γ (PLC γ). Ces interactions moléculaires activent de multiples voies de signalisation. Cette transduction du signal est suivie d'une activation spécifique des facteurs de transduction (TFs) tels que CREB, EGR1 et EGR3. Les changements dynamiques du pattern d'activation des gènes régulés par les facteurs de transduction influencent la survie neuronale, la plasticité structurelle et les performances cognitives. D'après Hu et Russek, 2008.

5- Effets physiologiques

Outre son rôle crucial dans l'embryogénèse du SNC (guidage des cônes de croissance des neurones, survie des neurones, croissance dendritique) (Cohen-Cory et al., 2009 pour revue), le BDNFm via l'activation des récepteurs TrkB-FL est reconnu comme l'un des principaux médiateurs moléculaires de la plasticité synaptique du cerveau adulte (Mc Allister

et al., 1999 ; Lu, 2003 ; Waterhouse et Xu, 2009 pour revues). Ainsi, de nombreuses études ont été consacrées aux effets du BDNF sur la LTP (potentialisation à long terme), un des modèles expérimentaux de plasticité synaptique le plus utilisé. Le BDNF exogène facilite la LTP étudiée sur des tranches d'hippocampe (Figurov et al., 1996) ou de cortex visuel (Akaneya et al., 1997). Mieux, l'inhibition de l'activité du BDNF (animaux knockout pour le BDNF, blocage des récepteurs TrKB) diminue la LTP hippocampique (Korte et al., 1995 ; Xu et al., 2000), laquelle est restaurée après exposition à du BDNF recombinant (Patterson et al., 1996). Le BDNF est surtout essentiel à la phase tardive de la LTP (Xu et al., 2000), celle qui nécessite la synthèse de nouvelles protéines. Le rôle indispensable du BDNF dans la LTP et sa concentration élevée dans l'hippocampe (région clé dans la mémoire déclarative) ont débouché sur de nombreux travaux visant à étudier la contribution du BDNF aux processus d'apprentissage et à la mémoire chez le rongeur (Cunha et al., 2010 pour revue). Ainsi, l'expression hippocampique des ARNm du BDNF augmente lors de l'apprentissage (labyrinthe de Morris, labyrinthe radial) et les stratégies anti-BDNF ont un impact négatif sur la mémoire. Par ailleurs, chez l'Homme, le polymorphisme BDNF Val66Met a une incidence négative sur la mémoire, sur le volume de l'hippocampe et son contenu en N-acetyl-aspartate, un marqueur de densité neuronale (Hariri et al., 2003 ; Pezawas et al., 2004 ; Hashimoto et al., 2008). L'anomalie réduit également la réponse plastique du cerveau à l'exercice physique (Pearson-Fuhrhop et al., 2009).

Le pro-BDNF est maintenant considéré comme un médiateur à part entière (Figure 5). Il aurait des effets opposés à ceux du BDNFm via l'activation des récepteurs p75^{NTR}. Ainsi, le pro-BDNF est considéré comme un inducteur de l'apoptose (Teng et al., 2005) et un médiateur capable d'induire la dépression synaptique à long terme (Woo et al., 2005).

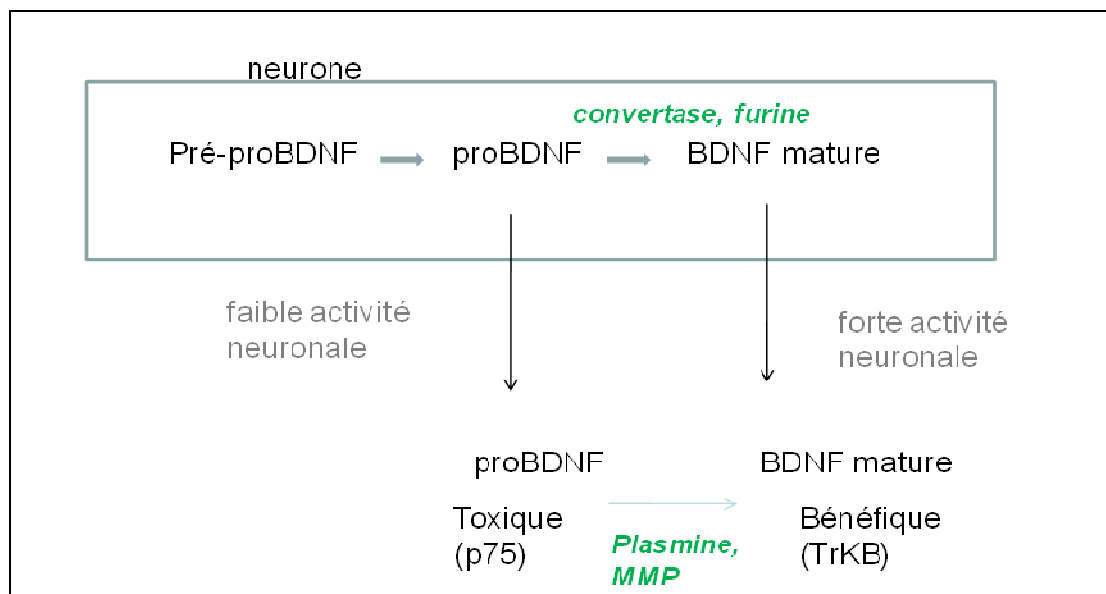


Figure 5 : Sécrétion de BDNF et pro-BDNF par les neurones.

B- BDNF circulant

Le BDNF est présent dans le sang et plus exactement dans le plasma et dans les plaquettes qui contiennent de grandes quantités de BDNF. Le rôle du BDNF sanguin n'est pas connu. Cependant, de l'association existante entre les taux circulants et cérébraux de BDNF dans certains travaux expérimentaux a émergé l'idée selon laquelle les taux sanguins du BDNF seraient un reflet fiable des taux de BDNF présents dans le cerveau. Ce point doit être vérifié car chez l'Homme, le BDNF est mesuré dans le sang. Les données qui suivent concernent le BDNF circulant en l'absence de toute pathologie, le BDNF étant mesuré par technique ELISA.

1- Origine

Chez l'Homme et le rat, le BDNF est retrouvé dans le sang à faible concentration. Les concentrations sériques sont 50 à 200 fois supérieures aux concentrations plasmatiques car les plaquettes, qui sont très riches en BDNF (Fujimura et al., 2002), sécrètent la neurotrophine quand les processus de coagulation sont activés (Rosenfeld et al., 1995 ; Radka et al., 1996). Les plaquettes sont dépourvues de noyau et donc incapables de synthétiser le BDNF. Par ailleurs, on sait que le BDNF présent dans les plaquettes ne provient pas des mégacaryocytes.

En revanche, les plaquettes sont capables de capter le BDNF. Aussi, il est admis que le BDNF présent dans les plaquettes provient du plasma. Le point qui reste à élucider est l'origine du BDNF présent dans le plasma. Il a d'abord été suggéré que le BDNF circulant provenait des neurones du système nerveux central car cerveau et moelle épinière sont les organes les plus riches en BDNF. Si c'est le cas, alors il faut admettre que le BDNF présent dans le liquide interstitiel cérébral peut se retrouver dans le sang jugulaire soit après traversée de la BHE soit après passage dans le liquide céphalorachidien (LCR). Pan et al (1998) ont mis en évidence l'existence d'un transport saturable du BDNF au niveau de la BHE du moins chez la souris mais les données n'ont pas été confirmées chez le rat (Podulso et Curran, 1996). Le LCR contient bien des traces de BDNF mais son origine cellulaire n'est pas connue. Un argument souvent cité en faveur de l'hypothèse d'une origine cérébrale du BDNF circulant est l'existence d'une association entre les taux cérébraux et circulants de BDNF. Ainsi, Karege et al (2002) montrent que chez le rat les taux de BDNF augmentent à la fois dans l'hippocampe et dans le sérum au cours de son développement post-natal. Cependant, des études plus récentes n'ont pas retrouvé de relation entre les variations de BDNF existant au niveau de certaines structures cérébrale et celles existant dans le plasma ou le sérum plasmatique (Mannari et al., 2008 ; Elfving et al., 2010a ; Luo et al., 2010). Une étude réalisée chez l'homme conclut également à la possibilité d'une origine cérébrale du BDNF circulant (Rasmussen et al. 2009). Dans cette étude, le BDNF est dosé dans le sang prélevé simultanément au niveau de l'artère radiale et de la veine jugulaire avant et après un exercice physique (rameur ergométrique, 4h). En faveur d'une origine cérébrale du BDNF est que sa concentration est plus élevée dans la veine que dans l'artère aussi bien au repos qu'à l'issue de l'exercice. Cependant, cette étude ne signifie pas que la source cellulaire du BDNF soit le neurone. La source peut être les cellules endothéliales des vaisseaux cérébraux. En effet, les cellules endothéliales qu'elles soient périphériques ou centrales sont capables de synthétiser du BDNF *in vitro* (Bayas et al., 1992 ; Wang et al., 2006) et des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent que des cellules endothéliales en culture répondent au shear stress (force qui mime l'augmentation de la vitesse du flux sanguin associé à l'exercice) par une surexpression de BDNF. Par ailleurs, un argument qui n'est pas en faveur d'une source neuronale du BDNF est que la différence artérioveineuse se normalise rapidement après arrêt de l'exercice alors que l'augmentation des taux cérébraux de BDNF persiste plusieurs jours après l'arrêt de l'exercice (Berchtold et al., 2010). Par ailleurs, outre les cellules endothéliales, d'autres cellules sont capables de synthétiser dans certaines conditions du BDNF et

constituent à ce titre une source potentielle du BDNF présent dans le plasma (Figure 6). Parmi ces cellules, on peut citer les lymphocytes, les monocytes, les cellules musculaires, les cellules endocriniennes et les cellules endométriales (Esteban et al., 1995 ; Nemoto et al., 1998 ; Kerschensteiner et al., 1999 ; Nakahashi et al., 2000 ; Krizsan-Agbas et al., 2003 ; Matthews et al., 2009).

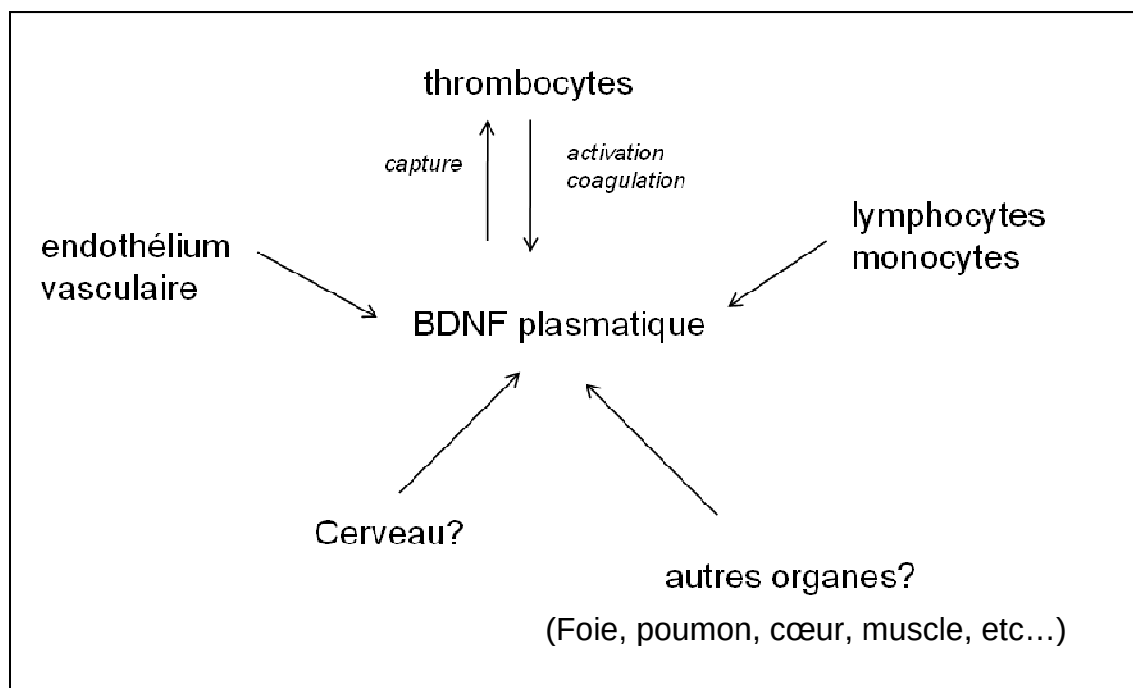


Figure 6 : Sources cellulaires du BDNF circulant

2- Déterminants

Un certain nombre d'études réalisées chez l'Homme, se sont intéressées aux facteurs capables d'influencer les taux circulants de BDNF. Parmi ces facteurs, on peut citer :

- Le cycle menstruel. Ainsi, les taux plasmatiques de BDNF sont plus élevés pendant la phase pré- que post-ovulatoire et plus faibles chez les femmes ménopausées et aménhorriques que chez les femmes fertiles. Par ailleurs, il existe une corrélation entre les taux de BDNF et les taux d'hormones sexuelles, positive pour l'œstradiol et négative pour la progestérone (Begliuomini et al., 2007).
- Le cycle nyctéméral pour le BDNF plasmatique (Begliuomini et al., 2008) dont les taux qui sont maximaux le matin corrént avec les taux circulants de cortisol.

- L'âge. Les taux sériques et plasmatiques de BDNF sont plus bas chez les personnes âgées (Lommatzsch et al., 2005, Ziegenhorn et al., 2007). Par ailleurs, une corrélation positive est observée entre les taux de BDNF et le volume de l'hippocampe entre 55 à 85 ans (Erickson et al., 2010).
- De nombreux indices de la santé cardiovasculaire et métabolique, du moins chez la personne âgée (Golden et al, 2010). Ainsi, les taux plasmatiques de BDNF sont corrélés de façon positive avec la pression artérielle diastolique et ceci indépendamment du sexe. Chez la femme, une association positive s'observe également avec l'indice de masse corporelle et le cholestérol (total et LDL) et chez l'homme avec les triglycérides.
- Des indicateurs du style de vie. Bus et al (2011) ont rapporté sur une large cohorte de patients (n=1118) d'un âge compris entre 18 et 65 ans que le tabagisme et l'urbanité étaient associés à des taux plus faibles de BDNF sérique et que les taux de BDNF étaient plus élevés chez les sujets les plus âgés mais uniquement chez les femmes.
- L'activité physique. Le taux circulant de BDNF augmente lors de l'exercice physique si il est suffisamment intense mais se normalisent rapidement après l'arrêt de l'exercice (Gold et al., 2003 ; Vega et al., 2006 ; Ferris et al., 2007 ; Rasmussen et al., 2009 ; Griffin et al., 2011). Cependant, le taux sérique de BDNF est plus faible (-17%) chez des hommes entraînés (16h/semaine, 3 ans) que sédentaires (Nofuji et al., 2008).

La multitude de facteurs susceptibles de modifier les taux circulants de BDNF explique probablement pourquoi les taux de BDNF dans le plasma et dans une moindre mesure dans le sérum varient d'une étude à l'autre et qu'il existe souvent une forte variabilité interindividuelle des taux circulants (Figure 7). Un autre facteur de variabilité concerne les conditions de prélèvement (à jeun ou pas), de conservation et d'analyse des échantillons sanguins (Elving et al., 2010b).

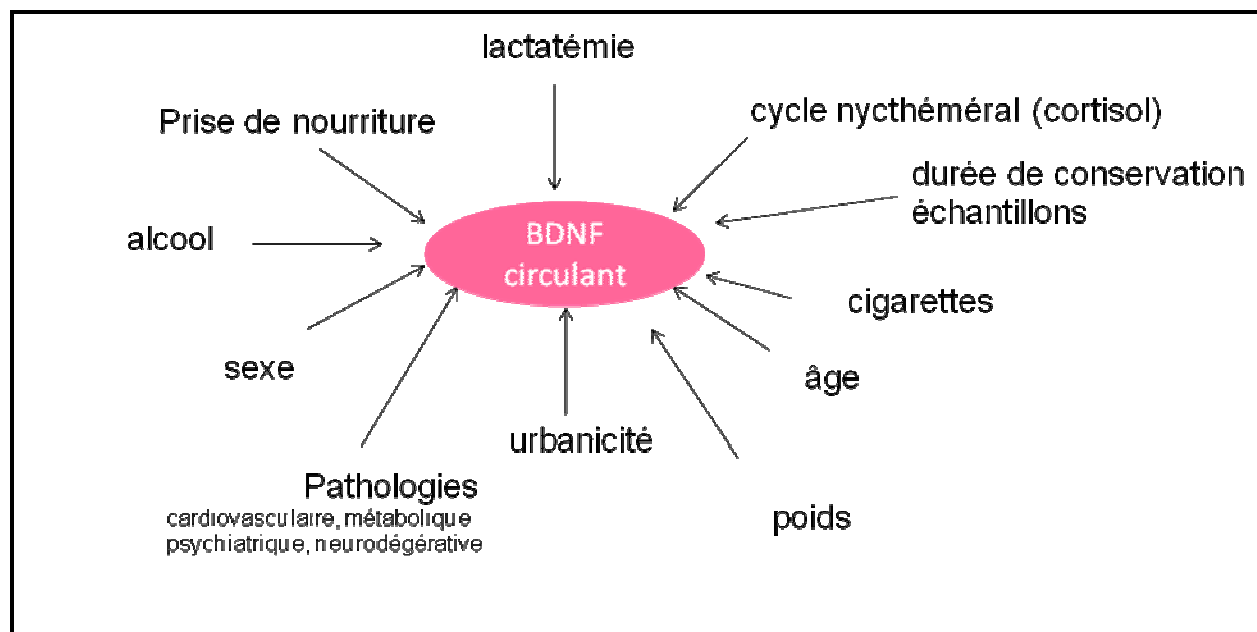


Figure 7 : Les déterminants potentiels du BDNF circulant.

C- BDNF et maladies neurologiques et psychiatriques chroniques

1- BDNF et dépression

La dépression est de loin la pathologie qui a fait l'objet du plus de travaux sur le BDNF et un certain nombre d'arguments plaident en faveur du rôle de la neurotrophine dans sa physiopathologie. Ainsi, les modèles animaux de dépression s'accompagnent d'une réduction de la synthèse hippocampique du BDNF (Smith et al., 1995 ; Rasmusson et al., 2002) et un traitement antidépresseur efficace augmente l'expression du BDNF et de son récepteur TrkB dans les structures limbiques et le cortex préfrontal (Nibuya et al., 1995 ; Russo-Neustadt et al., 1999 ; Maya Vetencourt et al., 2008 ; Mannari et al., 2008 ; Lee et al., 2011). De plus, l'efficacité des antidépresseurs est moindre chez les souris knockout hétérozygotes pour le gène *bdnf* ou son récepteur TrKB (Saarelainen et al., 2003) et l'administration systémique (Schmidt et Duman, 2010) ou intracérébrale (Shirayama et al., 2002 ; Hoshaw et al., 2005) de BDNF exerce un effet antidépresseur. Enfin, les taux post-mortem de BDNF dans l'hippocampe et le cortex préfrontal sont plus bas chez les sujets déprimés non traités que chez les sujets non déprimés ou déprimés mais traités par

antidépresseurs (Chen et al., 2001 ; Karege et al., 2005) et le polymorphisme val⁶⁶met, semble associé à un risque accru de dépression du moins chez l'homme (Verhagen et al., 2010).

Une méta-analyse de 15 et 5 études ayant comparé respectivement les taux de BDNF sériques et plasmatiques de sujets déprimés à ceux de sujets sains conclut à des taux plus bas de BDNF chez les sujets déprimés, avec des résultats plus reproductibles entre les études pour le BDNF sérique que plasmatique (Bocchio-Chiavetto et al., 2010). De plus, les traitements antidépresseurs semblent augmenter le BDNF sérique des sujets déprimés (Aydemir et al. 2005 ; Gonul et al., 2005). Cependant, l'existence d'une association entre dépression et faible taux circulant de BDNF ne signifie pas que la cause de la réduction du BDNF circulant soit une réduction des taux cérébraux. Il a été récemment montré sur un modèle génétique de dépression qu'il existait même une corrélation inverse entre le BDNF circulant et cérébral (Elfving et al., 2010c).

2- BDNF et Maladie d'Alzheimer

L'expression de l'ARNm du BDNF et de la protéine BDNF est diminuée dans différentes régions du cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer sur les prélèvements réalisés en post-mortem. Ainsi, les taux d'ARNm sont bas dans l'hippocampe, le cortex pariétal, le noyau basal de Meynert, et les taux de la protéine BDNF sont abaissés dans le cortex entorhinal, l'hippocampe, le cortex pariétal, temporal et frontal que ce soit en immuno-histochimie, ELISA ou Western Blot (Murray et al., 1994 ; Ferrer et al., 1999 ; Hock et al., 2000 ; Holsinger et al., 2000 ; Fahnestock et al., 2002 ; Lee et al., 2005 ; Peng et al., 2005). Par ailleurs, les taux de pro-BDNF et BDNFm mesurés dans le cortex pariétal sont positivement corrélés aux mesures cognitives dont le mini mental test et le score cognitif global (Peng et al., 2005). Concernant les taux sériques de BDNF, ils sont plus bas chez les patients présentant une maladie d'Alzheimer en comparaison à des sujets contrôles et augmentent sous l'effet d'un traitement par inhibiteur de l'acétylcholinestérase (Leyhe et al., 2008). Des résultats similaires sont retrouvés chez les patients avec un trouble cognitif léger sans démence (Yu et al., 2008). Ces données restent néanmoins controversées car d'autres études ont mis en évidence des résultats opposés suggérant une augmentation du BDNF sérique aux stades légers de la maladie comparativement aux taux observés à des stades plus avancés et chez les sujets sains (Laske et al., 2006, 2007 ; Angellucci et al., 2010). Enfin, les

malades Alzheimer porteurs du polymorphisme val⁶⁶met ont un risque de dépression multiplié par 2 à 3 (Borroni et al., 2009).

3- BDNF et Maladie de Parkinson

Sur les modèles animaux de maladie de Parkinson (administration de 1-méthyle 4-phényl 1,2,3,6-tétrahydropyridine ou de 6-hydroxydopamine, deux toxines des neurones dopaminergiques), le BDNF réduit la mort neuronale et les symptômes moteurs (Yoshimoto et al., 1995 ; Tsukahara et al., 1995 ; Levivier et al., 1995 ; Galpern et al., 1996 ; Hagg, 1998). Par ailleurs, les patients parkinsoniens ont une expression réduite du BDNF dans la pars compacta de la substance noire et dans le striatum (Mogi et al., 1999 ; Parain et al., 1999 ; Howells et al., 2000). Cette réduction est le résultat de la perte des neurones dopaminergiques et de la réduction de la synthèse du BDNF par les neurones survivants (Parain et al., 1999 ; Howells et al., 2000). Enfin, peu de données sont disponibles sur les taux circulant de BDNF chez le patient parkinsonien. Une étude récente incluant 47 patients parkinsoniens et 23 sujets contrôles a mis en évidence des taux de BDNF sérique significativement plus bas chez les malades ainsi qu'une corrélation positive des taux avec la durée d'évolution et la sévérité de la maladie (Scalzo et al., 2010). Quant aux études génétiques portant sur les liens entre le polymorphisme val⁶⁶met et le risque de maladie, elles offrent des résultats contradictoires et une méta-analyse réalisée par Zintzaras et Hadjigeorgiou en 2005 n'a pas retrouvé d'association significative.

4- BDNF et Maladie de Huntington

Le BDNF semble également jouer un rôle important dans la maladie de Huntington, maladie neurodégénérative autosomique dominante caractérisée par une expansion d'un triplet CAG dans le gène huntingtin, à l'origine d'une perte des neurones GABAergique du striatum. Ainsi, la maladie est associée à une réduction des concentrations striatales en BDNF (ARNm et protéine) et en récepteurs TrkB aussi bien chez l'Homme que chez l'animal (Zuccato et Cattaneo, 2007). De plus, comparés à des sujets sains, les patients atteints de la maladie d'Huntington ont des taux sériques de BDNF plus bas, et une corrélation inverse avec le nombre de répétitions de triplets CAG du gène huntingtin, la durée d'évolution et la sévérité de la maladie a été mise en évidence (Ciammola et al., 2007).

D- BDNF et accident vasculaire cérébral

Il existe de nombreux travaux sur le BDNF en cas d'accident vasculaire cérébral. Le BDNF a été mesuré dans le cerveau pour les travaux précliniques et dans le sang pour les travaux cliniques.

1- Effets de l'ischémie sur les taux cérébraux de BDNF

Les effets dans le temps et dans l'espace de l'ischémie cérébrale sur la synthèse et les taux du BDNF ont été relativement peu étudiés. Dans ces études, l'expression des ARNm du BDNF et/ou les taux de protéine totale (pro-BDNF + mBDNF) ont été évalués après induction :

- d'une ischémie focale (transitoire ou permanente) qui conduit à un infarctus ou
- d'une ischémie globale transitoire qui conduit non pas à un infarctus mais à une perte neuronale sélective et retardée (début à 24h, maximale à 3-7j de reperfusion) au niveau de l'hippocampe, la région CA1 étant la plus vulnérable (CA2, CA3 et gyrus denté étant épargnés).

Dans les modèles d'ischémie globale (cf Tableau 2), les dosages (expression/localisation des ARNm du BDNF essentiellement) ont été réalisés sélectivement dans l'hippocampe. Les résultats s'accordent à montrer que l'ischémie s'accompagne d'une induction précoce du gène codant BDNF dans toutes les régions de l'hippocampe mais que l'induction est plus marquée et durable dans les régions épargnées par la mort neuronale. Ils sont à l'origine de l'idée selon laquelle le BDNF augmente la résistance des neurones à l'ischémie et d'une façon plus générale que la synthèse du BDNF est une réponse de défense du cerveau à l'ischémie. Par ailleurs, aux temps tardifs, le taux de la protéine BDNF diminue dans CA1 (Kokaia et al., 1996, Yang et al., 2002, Lee et al., 2011), reflet de la mort neuronale. On peut également souligner que le traitement des animaux par des antagonistes des récepteurs au glutamate diminue l'effet de l'ischémie sur les taux des messagers indiquant que l'induction de *bdnf* implique en partie le glutamate (Lindvall et al., 1992).

Dans les modèles d'ischémie focale (cf Tableau 3), l'infarctus est cortical (cortex pariétal) et striatal en cas d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (OACM) et exclusivement cortical en cas d'occlusion vasculaire d'origine photothrombotique. Kokai et al (1995) ont montré qu'une ischémie non létale (OACM 15 min) conduit à une induction de *bdnf* (augmentation des ARNm) dans les régions corticales non exposées à l'ischémie et que l'induction s'étend à l'hippocampe si l'ischémie est létale (OACM 2h). Plus tard, la même équipe (Kokai et al., 1998) montre que l'OACM pendant 2h ne modifie pas les taux de la protéine BDNF dans le cortex pariétal, les diminue dans le striatum (à 24h) et les augmente dans le cortex périlésionnel. Utilisant le même modèle d'ischémie, Rickhag et al (2007) rapportent une augmentation précoce de l'expression des ARNm du BDNF dans le cortex cingulaire et le gyrus denté.

Sur le modèle d'infarctus cortical d'origine photothrombotique, Sulejczak et al (2007) ont dosé le BDNF dans le cortex ipsilatéral et controlatéral à la lésion. Les résultats montrent que l'ischémie ne modifie pas les taux controlatéraux mais augmente les taux dans le cortex lésé (aux temps 1 et 7j) et périlésionnel (au temps 7j). Sur le même modèle d'ischémie, notre laboratoire (Madinier et al., 2009) a confirmé que l'ischémie modifiait sélectivement les taux de BDNF dans le cortex ipsilatéral et montré que les variations des taux de BDNF étaient limitées à la phase aigue.

Tableau 2 : BDNF et ischémie globale transitoire

Auteurs	Durée d'ischémie	Temps de reperfusion	Techniques
Takeda et al., 1993	20 min (rat)	De 3 h à 7 j	Taux ARNm
Kokaia et al., 1996	10 min (rat)	1, 2, 4 et 18 h	Taux ARNm
		6, 12, 24 h et 7j	Taux protéine
Tsukahara et al., 1998	10 min (rat)	2, 4,8,16 et 24 h	Taux ARNm
Lee et al., 2002	3.5 min (gerbille)	2 h, 8 h et 1,2 et 7 j	Taux ARNm
Yang et al., 2002	20 min(rat)	2, 4, 6, 12, 24 h et 2, 4, 7 jours	Immunomarquage ARNm et protéine
Lee et al., 2011	5 min (gerbille)	1 et 4 j	protéine (Western Blot)

Tableau 3 : BDNF et ischémie focale

Auteurs	Modèle d'ischémie cérébrale	Temps d'études	Paramètres
Comelli et al., 1993	Focale permanente (infarctus cortical par photo-coagulation)	2, 4 et 18 h	ARNm
Kokaia et al., 1995	Ischémie focale (OACM) de 15 min	0.5, 2 et 4h de reperfusion	ARNm
	(pas de lésion) ou 2 h (lésion)	0.5, 2, 4 et 24h de reperfusion	Protéine (localisation)
Kokaia et al., 1998	Ischémie focale (OACM) de 2 h	2, 6 et 24 h de reperfusion	Protéine (taux et localisation)
Zhao et al., 2000	Ischémie focale permanente (OACM)	2 , 7, 12,2 0 et 30 j	ARNm
Sulejczak et al., 2007	Ischémie focale permanente (infarctus cortical par photo-coagulation)	1 et 7, 35j	Protéine (taux et localisation)
Rickhag et al., 2007	Ischémie focale transitoire de 2 h (OACM)	De 1.5 à 24 h de reperfusion	ARNm
Madinier et al., 2009	Ischémie focale permanente (infarctus cortical par photo-coagulation)	4, 24 h, 7, 14 et 30 j	Protéine (taux et localisation)

OACM : occlusion de l'artère cérébral

2- Source cellulaire du BDNF néo-synthétisé dans le cerveau

La mise en évidence par technique d'hybridation *in situ* d'une surexpression des ARNm codant le BDNF sélectivement dans les neurones a contribué à l'idée générale selon laquelle le neurone représente la source majeure du BDNF néo-synthétisé après induction d'une ischémie cérébrale (Comelli et al., 1992 ; Kokaia et al., 1995 ; Zhao et al., 2000 ; Rickhag et al., 2007). Cependant, ces études se sont focalisées sur la phase aiguë et il n'est pas exclu qu'en phase chronique d'autres types cellulaires puissent synthétiser du BDNF. La protéine BDNF a été ensuite localisée dans les cellules microgliales en phase aiguë (Madinier et al., 2009) et dans les astrocytes formant la cicatrice gliale en phase tardive (Sulejczak et al., 2007, Sato et al., 2009 ; Uchida et al., 2010). La présence de BDNF dans ces cellules pourrait signifier une induction de synthèse. En effet, les études *in vitro* montrent que ces cellules deviennent capables de synthétiser du BDNF quand elles sont exposées à des conditions qui miment l'ischémie (Lai et Todd, 2008, Miklic et al., 2004 ; Saha et al., 2006 ; Jean et al., 2008). Alternativement, la présence de BDNF à l'intérieur des cellules pourrait être le reflet de l'internalisation du BDNF extracellulaire. Pour trancher entre ces 2 possibilités, il est nécessaire d'étudier l'expression des ARNm à l'échelle cellulaire. Néanmoins, la possibilité que le neurone ne soit pas la source cellulaire unique du BDNF néosynthétisé au cours de l'ischémie nous a conduits à étudier dans quelle mesure l'augmentation des taux de BDNF associée à l'ischémie pouvait impliquer des cellules non neuronales. Ce point a été l'objet de notre premier travail.

3- BDNF circulant et accident vasculaire cérébral

Les taux circulants en cas d'AVC sont peu documentés et les données disponibles ont toutes été obtenues chez l'Homme. La première étude sur le sujet a porté sur 10 patients présentant un premier infarctus cérébral datant de moins de 24 heures (Di Lazzaro et al., 2007). Le BDNF était mesuré dans le plasma par technique ELISA à l'admission des patients puis de manière répétée le matin à 8 heures durant les 4 jours suivants. En dépit d'une rupture de la barrière hémato-encéphalique objectivée par l'augmentation des taux plasmatiques de la protéine S100 β dosée de manière concomitante, les auteurs ont rapporté une stabilité des taux de BDNF plasmatique. Néanmoins l'interprétation des résultats de cette étude reste délicate compte tenu du faible nombre de patients inclus dont peu avaient un déficit neurologique

sévère, d'un délai de premier prélèvement tardif et très variable d'un patient à un autre ($10.7 \text{ h} \pm 7.6$), et de l'absence de donnée sur le volume final de la lésion. Les 3 autres études se sont intéressées au couple BDNF-dépression chez des patients victimes d'un AVC. Dans une étude incluant 134 patients avec infarctus cérébral, Jiménez et al. (2009) ont dosé le BDNF sérique à 7 ± 2 jours et 30 ± 7 jours par technique ELISA. Aucune différence n'a été mise en évidence entre les patients ayant développé dans le mois suivant l'infarctus une dépression (22.1% du total des patients) et ceux indemnes de cette affection. Plus récemment, l'étude de Yang et al. a porté sur 100 patients admis dans les 24 heures suivant un premier infarctus cérébral (Yang et al., 2011). Le BDNF sérique était dosé le lendemain matin suivant l'admission et au septième jour par technique ELISA. Trois groupes de sujets ont été constitués : patients avec dépression diagnostiquée dans les 14 jours suivant l'infarctus cérébral, patients sans dépression et sujets contrôles. Les auteurs rapportent des taux de BDNF sérique à J.1 plus élevés dans le groupe des patients sans dépression comparé au groupe des patients avec dépression et aux sujets contrôles, sans différence notable observée à J.7. Après analyse multivariée incluant les données cliniques et radiologiques d'admission, un taux sérique bas de BDNF à J.1 était associé de manière indépendante à une augmentation du risque de dépression chez les patients présentant un infarctus cérébral. Ainsi, un taux inférieur à 5.86 ng/ml prédisait ce risque avec une sensibilité de 81% et une spécificité de 86%. Les auteurs en sont venus à la conclusion par raisonnement inverse que des taux plus élevés de BDNF sérique pourraient refléter les taux de BDNF cérébral dont l'effet bénéfique sur la plasticité cérébrale est connu, et témoigner ainsi d'une protection contre l'apparition d'une dépression post-AVC. De manière similaire, dans une autre étude portant sur 93 patients présentant un infarctus cérébral, Zhou et al. (2011) ont retrouvé des taux sériques de BDNF mesurés entre 3 mois et 6 mois significativement plus bas chez les patients développant une dépression post-AVC. Dans cette étude, les concentrations sériques de BDNF n'étaient pas associées au polymorphisme val⁶⁶met, ce dernier ayant pourtant été identifié comme augmentant le risque de dépression chez l'homme (Verhagen et al., 2010).

Les études cliniques ne renseignent pas sur les taux circulants avant ischémie d'où l'impossibilité de savoir si l'ischémie modifie le BDNF circulant comme elle le fait sur les taux cérébraux. En effet, évaluer les effets de l'ischémie en comparant les taux de BDNF chez des patients victimes d'un AVC et chez des patients contrôles du même âge semble peu pertinente compte-tenu des nombreux déterminants du taux circulant de BDNF (cf III-B-2).

Aussi, dans notre second travail, les taux circulants de BDNF ont été mesurés avant et à différents temps après induction d'une ischémie cérébrale chez le rat. Nous avons également évalué l'association qui pouvait exister entre les taux circulants et les taux cérébraux.

4- Rôle du BDNF endogène en cas d'ischémie cérébrale

Différents protocoles ont été utilisés pour évaluer le rôle du BDNF néosynthétisé par le cerveau en post-AVC : étude des effets du BDNF exogène, conséquence des stratégies qui bloquent l'effet du BDNF (antagonistes des récepteurs TrKB, souris KO *bdnf*) ou de celles qui potentialisent les effets de l'ischémie sur la production cérébrale de BDNF.

L'administration précoce par voie systémique ou locale (intraparenchymateuse, intraventriculaire) du BDNF diminue la mort neuronale hippocampique induite par l'ischémie globale transitoire (Tsukahara et al., 1994 ; Beck et al., 1994 ; Wu et Pardridge, 1999) ou le volume d'infarctus induit par l'ischémie focale (Schäbitz et al., 1997 ; Yamashita et al., 1997) suggérant que le BDNF endogène exerce un effet neuroprotecteur vis-à-vis de l'agression ischémique. En accord avec cette idée, le volume d'infarctus est plus élevé chez des souris *KO bdnf* que chez les souris sauvages (Endres et al., 2000). Différents mécanismes pourraient être impliqués : réduction de l'excitotoxicité du glutamate, inhibition de l'apoptose, modulation de l'inflammation locale (Schäbitz et al., 2000, Cheng et al., 1994 ; Jiang et al., 2011).

Au-delà de son effet neuroprotecteur, plusieurs arguments plaident en faveur de l'implication du BDNF endogène dans l'induction de la plasticité post-lésionnelle. Ainsi, l'administration i.v. de BDNF à faible dose améliore la récupération fonctionnelle sensori-motrice et les performances comportementales et cognitives sans toutefois affecter le volume de lésion (Kiprianova et al., 1999 ; Schäbitz et al., 2004 ; Schäbitz et al., 2007 ; Müller et al., 2008). De plus, les stratégies qui augmentent les taux cérébraux de BDNF potentialisent les changements neuroplastiques induits par l'ischémie et améliorent la récupération fonctionnelle. Parmi ces stratégies, on peut citer :

- la thérapie cellulaire : transplantation intracérébrale de cellules de moelle osseuse (Chen et al., 2000) ou de cellules souches neuronales génétiquement modifiées

sur-exprimant le BDNF (Zhu et al., 2011), administration systémique ou locale de cellules microgliales (Narantuya et al., 2010)

- l'activité physique imposée (tapis roulant) ou volontaire (roue d'entraînement) (Kim et al., 2005 ; Ploughman et al., 2009 ; Ke et al 2011)
- les médicaments comme par exemple l'atorvastatine (Chen et al., 2005), le nefiracetam (Ando et al., 2005), .

Il existe cependant un argument de taille contre l'effet plastique du BDNF endogène en cas d'ischémie, à savoir une récupération neurologique plus importante chez les souris KO *bdnf* que chez les souris sauvages (Nygren et al., 2006), le volume de lésion n'étant pas différent entre les 2 groupes. Un autre argument est que l'environnement enrichi qui exerce des effets positifs sur la plasticité post-lésionnelle et la récupération fonctionnelle post-AVC est associé à une réduction des taux de BDNF cérébral (Zhao et al., 2000 ; 2001).

Les antidépresseurs de la famille des IRSS augmentent les taux de BDNF chez les animaux sains ou soumis à une ischémie globale transitoire (Lee et al., 2011). Mieux, un traitement de 14 j par la doluxétine, un autre antidépresseur (inhibiteur de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline) augmente chez le rat les taux de la forme mature du BDNF dans le cortex préfrontal mais est sans effet sur les taux circulants de BDNF (Mannari et al., 2008). Ce type de traitement pharmacologique (injection unique en phase aigue) conduit chez le patient victime d'un AVC à un remodelage des cartes motrices corticales (cf II-C). Ces données nous ont conduits à étudier l'effet d'un traitement chronique par un IRSS chez les patients victimes d'un AVC.

Enfin, il existe un certain nombre de travaux en faveur du rôle positif du BDNF endogène sur la neurogénèse et l'angiogénèse induite par l'ischémie cérébrale, deux processus impliqués dans la récupération fonctionnelle ou comportementale. Par exemple, l'administration intraventriculaire ou systémique de BDNF chez le rat augmente le nombre de nouveaux neurones dans les régions qui bordent l'infarctus (Schabitz et al., 2007, Keiner et al., 2009) Dans le même ordre d'idées, le cilostazol (un inhibiteur de phosphodiesterase) augmente les taux de BDNF et la neurogénèse dans un modèle souris d'infarctus (Tanaka et al., 2010). Des effets semblables associés à une augmentation de la densité des microvaisseaux ont été rapportés après traitement par l'érythropoïétine (Wang et al., 2004).

Enfin, la réponse angiogénétique du cerveau à l'ischémie (OACM 30 min) ainsi que la récupération fonctionnelle est plus faible chez les souris homozygotes Val66Met que chez les animaux sauvages, alors que le volume de lésion n'est pas différent entre les 2 souches (Qin et al., 2011).

Méthodologie

I- Etudes animales

A- Animaux

L'ensemble des expérimentations ont été conduites selon les règles de la législation de l'expérimentation animale (Ministère français de l'agriculture, licence 1308) et en accord avec le Comité d'Ethique de l'Université de Bourgogne. Les expériences ont été menées sur des rats Wistars mâles (Dépré, Saint Doulchard, France) d'un poids initial compris entre 300 et 350 grammes, ayant libre accès à l'eau et à la nourriture, et maintenus dans une animalerie avec un cycle jour/nuit de 12/12 heures. Les animaux ont été hébergés par groupes de 5, et individuellement dans les 24 premières heures suivant l'induction de l'ischémie cérébrale.

B- Techniques physiologiques

1- Modèle d'ischémie multifocale permanente par embolisation

a- Induction de l'ischémie

Le modèle est pratiqué au laboratoire depuis de nombreuses années (Bralet et al., 1979). Chaque rat est préalablement pesé puis anesthésié à l'hydrate de chloral 4% injecté par voie intra-péritonéale (400 mg/kg, 10 ml/kg). L'animal est ensuite installé en décubitus dorsal sur une planchette, les pattes avant scotchées en croix et les incisives passées sous un élastique. Une incision est alors réalisée sur la ligne médiane du cou jusqu'à découvrir les muscles sterno-hyoïdiens, sterno-mastoïdiens et omo-hyoïdien. Par dissection minutieuse, l'artère carotide commune puis l'artère carotide externe gauches sont isolées. Cette dernière est ligaturée par un fil placé juste après sa naissance de l'artère carotide commune (fil à coudre DMC, 100% coton). Deux fils sont également mis en place autour de la carotide commune, l'un côté cœur, l'autre côté cerveau, avec un nœud confectionné mais non serré. Une petite cale plastique est installée sous la carotide commune, entre les 2 fils en attente, définissant ainsi le site d'injection et la stabilité du vaisseau.

L'embolisation de l'hémisphère gauche est alors réalisée. Elle consiste en l'injection d'une solution contenant des microsphères en carbone calibrées à $50 \pm 10 \mu\text{m}$ (laboratoire 3M, Cergy-Pontoise, France). La suspension est préalablement préparée dans une solution de

polyvinylpyrrolidone (PVP) à 20% afin de ralentir la vitesse de sédimentation des microsphères. Des concentrations de 2000, 3000 ou 4000 microsphères dans un volume de 200 µl sont réalisées, permettant de faire varier ainsi le nombre de microsphères injectées d'un animal à l'autre et par conséquent, le degré d'embolisation cérébrale. La concentration de microsphères est contrôlée pour chaque préparation par comptage au microscope d'un aliquot de 10 µl de celle-ci, après dilution au 1/10^{ème}. Après prélèvement dans une seringue de 1ml de 100 µl de PVP seul qui serviront à rincer la seringue et l'aiguille en fin d'injection, 200 µl de la solution PVP/microsphères à la concentration choisie et maintenue sous agitation vigoureuse sont alors prélevés. L'aiguille (Terumo 26^{1/2}G) est alors introduite dans l'artère carotide commune gauche et l'injection du volume total contenu dans la seringue (300 µl) est réalisée sous un débit régulier et lent, sans interrompre le flux sanguin, sur une durée d'environ 30 secondes. L'aiguille est laissée en place 30 secondes supplémentaires tout en maintenant le piston de la seringue, de manière à ce que le sang, toujours circulant, entraîne les microsphères jusqu'au cerveau. Ensuite, l'aiguille est retirée et le vaisseau est ligaturé en amont et en aval du site d'injection à l'aide des 2 fils préalablement disposés. La plaie est refermée à l'aide d'agrafes chirurgicales (12 mm, Bruneau) puis l'animal est placé en cage individuelle et hébergé en salle de réveil, en atmosphère calme et sous une température ambiante comprise entre 24 et 28°C.

Pendant toute la chirurgie, la température corporelle de l'animal est contrôlée et maintenue à 37°C.

b- Détermination du degré d'embolisation

Ce modèle d'ischémie induit la formation d'infarctus multiples et de taille variable dans l'hémisphère ipsilatéral à l'injection. Les lésions affectent préférentiellement le cortex pariéto-temporal, l'hippocampe et les régions thalamostriées (Bralet et coll., 1979) (Figure 7). Le degré d'embolisation est évidemment proportionnel au nombre de microsphères injectées. Cependant, pour un même nombre de microsphères injectées, le nombre de microsphères présentes dans le cerveau peut varier du simple au triple du fait des variations inter-animales du réseau vasculaire cérébral mais aussi des variations dans la vitesse d'injection des microsphères par l'expérimentateur. Par conséquent, il est nécessaire de déterminer à posteriori chez chaque animal le degré d'embolisation cérébrale. Aussi, pour chaque rat, les culots des homogénats d'une part de l'hémisphère gauche embolisé, et d'autre part de

l'hémisphères droit sain (cf préparation des échantillons) sont récupérés et mis au contact d'une solution de 5 ml de potasse (KOH) à 20% pendant une durée de 24 heures. Chaque tube est ensuite centrifugé pendant 10 min, à 3000 tours/min puis 4 ml de la solution potassique sont retirés et le poids de chacun des tubes contenant le culot d'homogénat et le ml de KOH est déterminé. Après remise en suspension par agitation au vortex, 50 µl de la solution sont déposés sur une lame de verre, pesés, et un comptage des microsphères est alors réalisé sous microscope optique. L'opération est répétée à 3 reprises de manière à moyenner le nombre de microsphères observées. Le résultat est rapporté au poids de la solution présente dans le tube (dont le poids à vide est connu) après retrait des 4 ml, de façon à calculer le nombre de microsphères présentes dans chaque hémisphère embolisé.

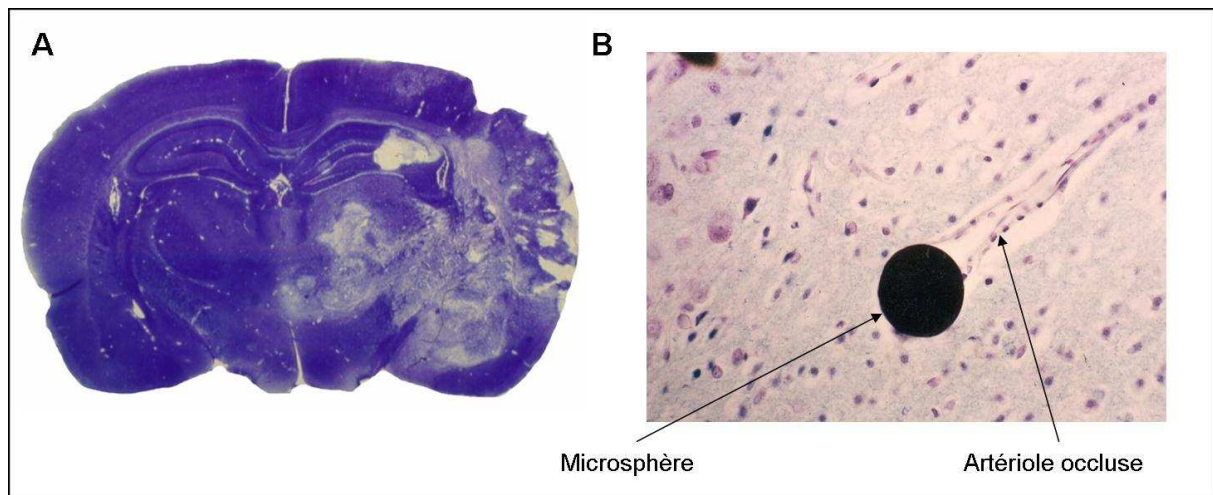


Figure 7 : Ischémie multifocale permanente par embolisation de l'artère carotide interne gauche. Notez la constitution d'infarctus cérébraux multiples au sein de l'hémisphère embolisé (A) et la visualisation au microscope d'une microsphère occluant une artériole (B).

2- Prélèvements sanguins

Le sang (1 ml) est prélevé avant et à différents temps suivant l'induction de l'infarctus cérébral au niveau de la veine jugulaire droite de l'animal à l'aide d'une seringue montée sur une aiguille de 26 G, et recueilli dans un tube hépariné pour recueil du plasma ou dans un tube non-hépariné (tube SST BD Vacutainer) pour recueil du sérum. Les échantillons sont conservés à +4°C au maximum pendant 2 heures avant d'être centrifugés (2000 g, 15 min, +4°C, centrifugeuse Jouan GR 412). Le plasma est centrifugé une deuxième fois (13000 g, 4 min, +4°C, centrifugeuse Sigma 3K30). Le plasma et le sérum sont alors immédiatement

séparés en aliquots de 110 µl dans des tubes Eppendorf et stockés à -80°C jusqu'à réalisation des dosages.

Les prélèvements sont réalisés soit sous anesthésie à l'hydrate de chloral 4% (400 mg/kg, 10 ml/kg IP) soit sous halothane (pour les temps intermédiaires). Nous avons auparavant vérifié que la nature de l'anesthésique ne modifiait pas les taux circulants de BDNF. Enfin, l'ensemble des prélèvements sanguins ont été réalisés en journée entre 10 h et 14 h.

3- Prélèvements cérébraux

a- Prélèvements cérébraux pour dosage du BDNF

Après anesthésie à l'hydrate de chloral 4% (400 mg/kg, 10 ml/kg IP), le rat est placé en décubitus dorsal, sur une planchette, les pattes antérieures étant scotchées en croix. Une laparotomie est alors pratiquée juste en dessous du sternum à l'aide de gros ciseaux, permettant ensuite la réalisation d'une thoracotomie pour ouverture complète de la cage thoracique. Une petite incision est réalisée dans la paroi du ventricule gauche afin d'y insérer une canule métallique qui est remontée jusqu'à l'aorte et qui permet la perfusion transcardiaque du cerveau avec du sérum physiologique (NaCl à 9%). Une autre incision est immédiatement réalisée au niveau de l'oreillette droite permettant ainsi l'écoulement du sérum physiologique. Le réservoir de sérum physiologique est placé à une hauteur de 140 à 160 cm de l'animal, fournissant ainsi une pression de 100 mmHg. La perfusion dure 5 minutes et permet d'éliminer le sang présent dans les vaisseaux cérébraux. Immédiatement après la perfusion transcardiaque, l'animal est décapité et le cerveau est extrait de la boîte crânienne. Il est disséqué sur une plaque en verre reposant sur de la glace. Après élimination du cervelet, du tronc cérébral, de l'hypothalamus et du mésencéphale, les 2 hémisphères sont séparés. Les échantillons sont pesés puis conservés à -80°C jusqu'à réalisation des dosages.

b- Prélèvements cérébraux pour études immuno-histochimiques

L'anesthésie et la mise en place de l'animal sont identiques à celle décrite pour le dosage du BDNF. Une perfusion transcardiaque du cerveau avec du sérum physiologique (NaCl à 9%) suivie d'une perfusion avec une solution de paraformaldéhyde 4 % dans un

tampon phosphate 0.1 M (pH 7,4) sont réalisées. Immédiatement après les perfusions transcardiaques, l'animal est décapité et le cerveau est extrait de la boîte crânienne. Le cerveau est alors placé dans cette même solution pour une durée de 1 heure puis transférée pour 48 h dans une solution contenant 20 % de sucrose dans un tampon phosphate 0.4 M (pH 7,4). Ensuite, le cerveau est congelé à -40°C dans l'isopentane puis conservé à -80°C.

De multiples sections de 20 µm débutant à 1,7 mm de bregma et s'étendant en arrière à 4 mm, sont réalisées à l'aide d'un cryostat (HM550 OMPV, Microm, Francheville, France) à -20°C et collectées sur des lames SuperFrost Plus.

C- Dosages du BDNF circulant et tissulaire

1- Préparation des échantillons tissulaires pour dosage du BDNF

Les hémisphères cérébraux sont homogénéisés chacun dans un tube de 20 ml à l'aide d'un ultraturax dans un tampon d'extraction (700 µl/100 mg de tissu) dont la composition est la suivante :

- Tris (Trizma base) : 100 mM
- NaCL : 150 mM
- EGTA : 1 mM
- Triton X-100 : 1%
- Cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma P8340) : 1%
- pH= 7,4

L'homogénat est passé aux ultrasons pendant environ 15 secondes puis subit une première centrifugation (2500 g, 15 min, +4°C). Une fraction du surnageant est répartie dans des Eppendorf de 1,5 ml pour être centrifugée à 10000 g durant 20 min, à +4°C. Le surnageant obtenu est réparti en tubes Eppendorf de 0,5 ml et stocké à -80°C dans l'attente des dosages. Le reste du surnageant, soigneusement pipeté au dessus du culot est également stocké à -80°C (réserve). L'autre fraction du surnageant est recueilli dans un Eppendorf de 1,5 ml, centrifugé (10.000 tours/min, 20 min, +4°C), le culot est ensuite récupéré en vue du comptage des microsphères (cf détermination du degré d'embolisation).

2- Réalisation des dosages du BDNF circulant et tissulaire

Les dosages du BDNF circulant (plasmatique et sérique) et tissulaire sont réalisés par méthode ELISA, à l'aide d'un kit Chemi kineTM (laboratoire Millipore). L'échantillon (100µl) est introduit dans les puits de la microplaque du kit. Les parois de ces puits sont tapissées d'anticorps anti-BDNF polyclonaux qui fixent le BDNF de l'échantillon. La microplaque est alors incubée pendant une nuit, à une température de +4°C, sous agitation lente. Après rinçage minutieux des puits, 100 µl d'anticorps biotinylés anti-BDNF sont ajoutés dans chacun d'eux. Le BDNF de l'échantillon est alors pris en sandwich entre ces deux anticorps. La plaque est alors incubée à température ambiante et sous agitation lente pendant 3 heures. Un nouveau rinçage est ensuite réalisé et 100 µl d'une solution de streptavidine-HRP sont introduits dans chaque puits. La streptavidine qui a une très forte affinité pour la biotine va alors se fixer à l'anticorps mis précédemment. Après une nouvelle incubation d'une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière, 100 µl d'une solution de TMB/E sont introduits dans chaque puits. Ce chromogène TMB/E réagit avec l'enzyme HRP en donnant une coloration bleue du milieu. Après exactement 15 min d'incubation à température ambiante, sous agitation lente, la réaction est arrêtée par une solution de blocage pour donner une coloration jaune. La densité optique (450 nm) est lue immédiatement après à l'aide d'un lecteur de microplaque. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de BDNF qui est calculée à partir d'une gamme d'étalonnage préparée à l'aide d'une solution mère de BDNF fournie dans le kit et dont la concentration est connue.

Des études préliminaires ont été conduites afin d'évaluer si l'échantillon à doser devait être introduit pur ou dilué dans les puits. Nous avons choisi de diluer les échantillons cérébraux au 1/10 dans le tampon d'extraction puis ensuite au ½ dans le diluant fourni par le kit et préalablement supplémenté en albumine sérique bovine (2%). En revanche, les échantillons circulants sont introduits dans les puits non dilué pour les plasmas et dilués au 1/20 pour les sérums.

D- Etude de la localisation cellulaire du BDNF

Après rinçage dans une solution de PBS (pH 7,4), les coupes de cerveau sont traitées durant 10 minutes avec une solution de protéinase K (10µ/ml) à température ambiante pour récupération des antigènes et mises en incubation durant 2 heures dans une solution PBS de manière à bloquer les sites de liaison non-spécifiques. Ensuite, les coupes sont mises en

incubation durant 3 jours à une température de +4°C dans la même solution contenant un anticorps polyclonal de lapin reconnaissant le BDNF (dilution 1 :100) en présence d'anticorps monoclonaux reconnaissant soit OX-42 (dilution 1:100), GFAP (dilution 1:500) ou NeuN (dilution 1:500) de manière à évaluer l'expression de BDNF dans respectivement les cellules microgliales/macrophages, les astrocytes, ou les neurones. Après 3 lavages de 10 minutes dans le PBS, une incubation de 3 heures en présence d'IgG anti-souris conjuguées au fluorochrome Alexa 488 et /ou d'IgG anti-lapin conjuguées au fluorochrome Alexa 568 est réalisée. Des coupes contrôles sont réalisées en omettant les anticorps primaires. Les coupes sont ensuite recouvertes d'une préparation fluorescente contenant 1.5 µg/ml de DAPI (Vectashield Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, USA) et observées en microscopie confocale (LEICA SP2, AOBS). L'expression du BDNF dans les différentes cellules cérébrales est gradée selon une échelle allant de 0 à 3 (0 : absence d'expression ; 1 : expression légère ; 2 : expression modérée ; 3 : expression forte) par 2 personnes en aveugle des conditions expérimentales.

E- Etude de l'expression de GFAP

Une analyse par immunoblot est réalisée sur les homogénats de cerveau ayant servi à la mesure des taux de BDNF. Une fraction aliquote de chaque échantillon tissulaire homogénéisé correspondant à 10 µg de protéines totales est diluée dans une solution contenant 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2 % SDS, 10 % glycerol, 0.01 % bromophenol bleu et chauffée à 85°C durant 10 minutes. Les protéines totales sont séparées selon la technique de Laemmli (1970) dans 10 % SDS-PAGE. Les protéines sont alors transférées par électrophorèse sur une membrane de polyvinylidènefluoride (PVDF, 0,2µm, Amersham Biosciences, Orsay, France) dans un tampon (25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glycine, 20 % methanol). Afin de bloquer les sites non spécifiques, la membrane de PVDF, préalablement séchée sur du papier filtre, est placée une nuit à +4°C dans du tampon TBS-T (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) auquel est ajouté 5 % de lait écrémé (Régilait). Après 3 lavages successifs de 10 minutes dans du tampon TBS-T, la membrane de PVDF est mise en incubation durant 4 heures à température ambiante en présence d'anticorps monoclonaux anti-GFAP (dilution 1:2000) puis durant 90 minutes en présence d'anticorps secondaires anti-souris couplés à la peroxydase de Raifort (dilution 1:5000). Les membranes

sont alors découpées et incubées en présence d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la β -actine (dilution 1:5000) pour servir de contrôle interne.

La révélation des complexes antigènes-anticorps est réalisée par chimiluminescence à l'aide du kit ECL+ (Enhanced Chemiluminescence Plus, Amersham, Biosciences, Orsay, France). Chaque membrane étant placée dans l'ECL, il se forme un ester d'acridinium sous l'influence de la peroxydase de Raifort fixée à l'anticorps secondaire. L'ester donne naissance à un composé excité dont le passage à l'état basal s'accompagne de l'émission de lumière. Celle-ci est détectée à l'aide d'un film photographique (Hyperfilm ECL, Amersham, Biosciences, Orsay, France). L'impression du film est proportionnelle à l'activité peroxydasique, donc à la quantité de GFAP ou de β -actine. En pratique, chaque membrane est incubée pendant 5 minutes avec les réactifs du système ECL+ à raison de 0,125ml/cm² de membrane, puis enveloppée dans du papier Saran Wrap, avant d'être mise en contact avec le film photographique. Le film est ensuite passé successivement dans des bains révélateurs et fixateurs, rincé à nouveau, puis séché. L'ensemble de ces étapes est réalisé en chambre noire. L'intensité des bandes obtenues est analysée par densitométrie (GS-800, BioRad Laboratories). Les données sont exprimées en unités arbitraires.

II- Etude clinique

Pour cette étude, nous avons utilisé la méthodologie d'un essai thérapeutique randomisé contrôlé contre placebo.

A- Sélection des participants

Les patients âgés de 18 à 85 ans présentant un infarctus cérébral datant de 5 à 10 jours à l'origine d'une hémiparésie ou d'une hémiparésie ont été identifiés à partir de 9 unités neurovasculaires en France (Toulouse Purpan, Toulouse Rangueil, Dijon, Paris Sainte Anne, Paris Pitié Salpêtrière, Grenoble, Pontoise, Nantes, Besançon).

L'échelle de Fugl-Meyer (FMMS) a été utilisée pour quantifier le déficit moteur des patients. Cette échelle avait été choisie car elle possède une excellente fiabilité et validité inter et intra-observateurs, et est capable de détecter des variations même minimes de la fonction

motrice (Gladstone et al., 2002). Les patients pour lesquels le score FMMS était initialement inférieur ou égal à 55 étaient éligibles pour cette étude.

Les critères d'exclusion des patients étaient les suivant :

- Score "National Institutes of Health Stroke Scale" (NIHSS) > 20
- Handicap ou déficit préalable interférant avec les évaluations cliniques (déficit moteur, trouble de la compréhension, aphasie sévère)
- Dépression cliniquement définie
- Dépression définie selon un score à l'échelle Montgomery Asberg Rating Scale (MADRS) > 19
- Prise de traitements antidépresseurs, inhibiteurs de la monoamine oxydase, neuroleptiques, benzodiazépines dans le mois précédant l'inclusion
- Patients devant bénéficier d'une endartériectomie carotidienne
- Grossesse
- Autre pathologie grave pouvant altérer le suivi des patients

L'étude a été approuvée par le comité de protection de personnes (CPP) de Toulouse. Les patients devaient signer un consentement avant d'être inclus.

B- Procédures

Les patients étaient randomisés pour recevoir par voie orale soit la fluoxétine (20 mg/jour), soit le placebo, durant 90 jours. De plus, tous les patients ont bénéficié d'une rééducation motrice par kinésithérapie selon les procédures locales propres à chaque centre.

Le critère principal de jugement était la récupération motrice clinique appréciée par la modification du score FMMS entre l'inclusion du patient et le 90^{ème} jour de traitement, évalué par un kinésithérapeute.

Les critères secondaires de jugement étaient les suivant :

- Modification du score NIHSS
- Modification du score modifié de Rankin (mRS)
- Modification du score MADRS

Tous ces scores étaient évalués à l'inclusion, au 30^{ème} jour et au 90^{ème} jour.

Les effets secondaires et les décès survenant dans les 3 mois de suivi des patients étaient également enregistrés. Si une dépression (cliniquement définie) survenait, les investigateurs devaient poursuivre le traitement en aveugle, et administrer, si nécessaire, en supplément un traitement par fluoxétine en ouvert à la dose de 20 mg/jour. Si un autre traitement antidépresseur était introduit, le traitement d'étude était arrêté.

Présentation des travaux

I- Etude 1 : Contribution des cellules non neuronales à la production du BDNF après un infarctus cérébral. Etude cinétique chez le rat.

Publication originale : Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats.

Béjot Y, Prigent-Tessier A, Cachia C, Giroud M, Mossiat C, Bertrand N, Garnier P, Marie C. *Neurochem Int.* 2011;58:102-11.

A- Objectifs de l'étude

Après une ischémie focale, les taux de BDNF augmentent au niveau et à proximité de la lésion. La localisation exclusivement neuronale des ARNm du BDNF est à l'origine de l'idée selon laquelle les neurones représentent le seul type cellulaire répondant à l'ischémie par une surproduction de BDNF (Comelli et al., 1992 ; Kokaia et al., 1995 ; Zhao et al., 2000 ; Rickhag et al., 2007). Cependant, les études sur culture de cellules révèlent que les cellules non neuronales (cellules endothéliales et gliales) sont capables de synthétiser du BDNF quand elles sont exposées à des conditions qui miment l'ischémie (Miklic et al., 2004 ; Saha et al., 2006 ; Jean et al., 2008 ; Lay et Todd, 2008).

Aussi, l'objectif de cette étude était d'identifier la nature des cellules responsables de la production de BDNF à différents temps après induction d'une ischémie cérébrale chez le rat.

B- Méthodes

L'ischémie a été induite chez le rat par embolisation unilatérale du cerveau avec un nombre variables de microsphères afin de mimer le large panel de sévérité observé en clinique (cf méthodologie). Les cerveaux étaient prélevés avant et après (4h, 24h, 8j) embolisation en vue :

- du dosage du BDNF (méthode ELISA) dans chacun des hémisphères.

- de la mesure de l'expression de GFAP (marqueur de l'activation astrocytaire) dans l'hémisphère embolisé.
- de la détermination de la localisation cellulaire du BDNF.

De façon importante, les rats inclus dans l'étude ont été sélectionnés à partir de leur degré d'embolisation (nombre de microsphères présentes dans le cerveau). Ainsi, chaque groupe de rats ischémiés comportait des animaux faiblement, moyennement et fortement embolisés, mais la distribution du degré d'embolisation ne différait pas entre les groupes.

C- Principaux résultats

- L'ischémie augmente le taux de BDNF dans l'hémisphère embolisé de façon précoce (+ 50% à 4h), et prolongée (+ 25% à 8j) avec un pic observé à 24h (+ 145%).
- Une augmentation plus modeste et moins prolongée est également observée dans l'hémisphère non embolisé.
- Le taux de BDNF qu'il soit mesuré dans l'hémisphère embolisé ou non embolisé n'est pas corrélé au degré d'embolisation sauf au temps 8j, temps auquel d'ailleurs une corrélation linéaire existe entre le degré d'embolisation et l'activation astrocytaire observée au niveau de l'hémisphère lésé.
- Avant ischémie, l'expression cellulaire du BDNF est neuronale et dans une moindre mesure épendymaire.
- Après ischémie, la surproduction de BDNF observée dans l'hémisphère embolisé implique non seulement les neurones survivants, mais aussi les épendymocytes (à 4h), les cellules endothéliales (à 4h et 24h), les cellules microgliales (à 24h seulement) et les astrocytes (à 8j).
- En revanche, l'expression de BDNF dans l'hémisphère non lésé est le fait des neurones et dans une moindre mesure des cellules épendymaires.

Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats

Yannick Béjot^{a,b,c,d}, Anne Prigent-Tessier^{a,b}, Claire Cachia^b, Maurice Giroud^{b,c,d}, Claude Mossiat^{a,b}, Nathalie Bertrand^{a,b}, Philippe Garnier^{a,b}, Christine Marie^{a,b,*}

^a Laboratoire INSERM U887 Motricité-Plasticité, Dijon F-21078, France

^b Université de Bourgogne, Dijon F-21079, France

^c Department of Neurology, University Hospital, Dijon F-21000, France

^d Centre d'Epidémiologie des Populations, EA4184, Dijon F-21000, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2010

Received in revised form 26 October 2010

Accepted 31 October 2010

Available online 11 November 2010

Keywords:

BDNF localization

BDNF production

Stroke

Brain ischemia

Rats

ABSTRACT

Although brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays a central role in recovery after cerebral ischemia, little is known about cells involved in BDNF production after stroke. The present study tests the hypothesis that neurons are not the unique source of neosynthesized BDNF after stroke and that non neuronal-BDNF producing cells differ according to the delay after stroke induction. For this purpose, cellular localization of BDNF and BDNF content of each hemisphere were analysed in parallel before and after (4 h, 24 h and 8 d) ischemic stroke in rats. Stroke of different severities was induced by embolization of the brain with variable number of calibrated microspheres allowing us to explore the association between BDNF production and neuronal death severity. The main results are that (a) unilateral stroke increased BDNF production in both hemispheres with a more intense and long-lasting effect in the lesioned hemisphere, (b) BDNF levels either of the lesioned or unlesioned hemispheres were not inversely correlated to neuronal death severity whatever the delay after stroke onset, (c) in the unlesioned hemisphere, stroke resulted in increased BDNF staining in neurons and ependymal cells (at 4 h and 24 h), (d) in the lesioned hemisphere, beside neurons and ependymal cells, microglial cells (at 24 h), endothelial cells of cerebral arterioles (at 4 h and 24 h) and astrocytes (at 8 d) exhibited a robust BDNF staining as well. Taken together, overall data suggest that non neuronal cells are able to produce substantial amount of BDNF after ischemic stroke and that more attention should be given to these cells in the design of strategies aimed at improving stroke recovery through BDNF-related mechanisms.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The brain derived neurotrophic factor (BDNF), a member of neurotrophin family protein, exerts strong survival and differentiation function during the development of the nervous system (Cohen-Cory et al., 2010). However, BDNF is still present in mature brain where it is stored and released from neurons in a use-dependent fashion and has been implicated in long term potentiation, learning and memory formation (Greenberg et al., 2009; Nagappan and Lu, 2005). BDNF also represents a crucial signalling molecule in adaptative brain plasticity after stroke

(Cowansage et al., 2010; Lipsky and Marini, 2007; Mattson, 2008). Interventions that improve recovery of function are most often associated with increased 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 reduces neuroplastic changes or recovery of function either spontaneous or induced by rehabilitation (Chen et al., 2005a; Madinier et al., 2009; Ploughman et al., 2009). From these data, pharmacological strategies aimed at increasing post-ischemic cerebral BDNF production appear to be a promising option in the treatment of stroke. A first step in the design of such approaches is the characterization of BDNF-producing-cells according to the delay after stroke onset.

Despite the central role of BDNF in recovery after stroke, the proper effect of stroke on cerebral BDNF production has been surprisingly poorly investigated. Available studies support increased BDNF production after stroke as suggested by increased

* Corresponding author at: Laboratoire INSERM U887 Motricité-Plasticité, Faculté de Pharmacie, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon, France. Tel.: +33 3 80 39 32 25; fax: +33 3 80 39 32 27.

E-mail address: chmarie@u-bourgogne.fr (C. Marie).

BDNF levels in areas collected either at the lesion site or around the lesion for at least one week following stroke (Kokaia et al., 1998; Madinier et al., 2009; Sulejczak et al., 2007). Because increased levels of BDNF mRNA were observed in degenerating and surviving neurons in the acute post-stroke period (Comelli et al., 1992; Kokaia et al., 1995; Rickhag et al., 2007; Zhao et al., 2000), it has been generally accepted that neurons are the predominant source of neosynthesized BDNF in the ischemic brain. However, the contribution of non neuronal cells is suspected from *in vitro* studies that report the ability of microglial cells, cerebral endothelial cells and astrocytes to express and secrete BDNF when exposed to conditions mimicking ischemia (Bayas et al., 2002; Jean et al., 2008; Lai and Todd, 2008; Miklic et al., 2004; Saha et al., 2006). *In vivo*, data reported BDNF expression by non neuronal cells such as astrocytes (Sato et al., 2009; Uchida et al., 2010) or microglia (Batchelor et al., 1999; Madinier et al., 2009; Nagamoto-Combs et al., 2007) but, to the best of our knowledge, studies specifically designed to assess their exact contribution to BDNF production are lacking.

In this context, the objective of our study was to investigate the contribution of neuronal versus non neuronal cells in stroke-induced BDNF production with respect of the delay after stroke onset. For this purpose, identification of BDNF-reactive cerebral cells was coupled to the measurement of BDNF levels in the whole hemispheres before and after (4 h, 24 h and 8 d) ischemic stroke in rats. Stroke was performed by means of intracarotid injection of calibrated microspheres (Bralet et al., 1979), a model which allows the modulation of neuronal death severity by varying the amount of injected microspheres (Demougeot et al., 2001). Thus, using this specific model of ischemia, if neurons are the predominant cellular source of BDNF, BDNF content of the lesioned hemisphere, which include both infarcted and surrounding non infarcted areas, should be inversely correlated to the degree of embolization. A first set of experiments was designed to investigate the relationship between individual hemispheric BDNF levels and degree of embolization, and the impact of embolization on hemispheric BDNF production. In a second set of experiments, cellular BDNF localization was examined before and after embolization. Then, based on the simultaneous analysis of changes in cells expressing BDNF and hemispheric BDNF levels, the time-dependent contribution of non neuronal versus neuronal cells to stroke-induced BDNF production was deduced.

2. Materials and methods

2.1. Materials

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 (Molsheim, France). The mouse monoclonal 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). 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-mouse antibody was obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories.

2.2. Animal care

All the experimental procedures were carried out on adult male Wistar rats (290–350 g, Depré, Saint-Doulchard, France). Rats were housed five per cage at 21 °C under an artificial 12-h light and 12-h dark period with light on at 7 a.m., and were allowed *ad libitum* access to food and water. The protocol was conducted according to the French Department of Agriculture guidelines (licence 1308).

2.3. Ischemic stroke model

Brain infarction was induced by irreversible occlusion of multiple arterioles in the left hemisphere and definitive ligation of the left common carotid artery (Bralet et al., 1979). Arterial occlusion was achieved by the injection into the left common carotid of variable amounts (2000, 3000 and 4000) of 50 µm calibrated microspheres (carbonized microspheres, 3 M, Cergy-Pontoise, France). This model results in multiple infarcts disseminated in the entire embolized hemisphere, the extent of infarcted areas being dependent on the degree of embolization. Briefly, after chloral hydrate anaesthesia (400 mg/kg, i.p.), 0.2 ml of a suspension of microspheres 20% polyvinylpyrrolidone (PVP) was collected in a syringe containing 0.1 ml of 20% PVP. Microspheres were then injected (0.3 ml for 25–30 s) into the left common carotid artery after ligation of the external carotid artery in order to prevent embolization of extracerebral tissues. Then, the left internal carotid artery was definitively occluded. As a strong correlation was reported between the degree of embolization and the hemispheric content in the neuronal marker N-acetyl-aspartate (Demougeot et al., 2001), neuronal death severity can be easily assessed from the determination of the degree of embolization. Intact rats were used as control animals.

2.4. BDNF level measurement

After chloral hydrate-anaesthesia and transcardial perfusion with saline in order to flush out blood from cerebral vasculature, the brain was removed, and the cerebellum, the hypothalamus and the mesencephale were discarded. The remaining hemispheres were then separated and homogenized in ice cold buffer containing trizma base (50 mmol/l), NaCl (150 mmol/l), EGTA (1 mmol/l), glycerol (10%), Triton (1%) and 1% protease inhibitors cocktail. After centrifugation (20 min at 10,000 × g at +4 °C), supernatants were stored at –80 °C until measurement of proteins and BDNF levels whereas tissue pellets were kept for assessing the degree of embolization. BDNF levels were determined with a commercial sandwich ELISA kit (Chemikine, Chemicon International, USA) 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 brain homogenates 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, PerkinElmer, Waltham, USA). All assays were performed in triplicate. Hemispheric BDNF levels were expressed in pg/mg of proteins.

2.5. Assessment of the degree of embolization

This determination was assessed by counting in the lesioned hemisphere the number of microspheres as previously described in details (Demougeot et al., 2001). The centrifugation pellets were dissolved in 5 ml of 20% KOH and centrifuged at 500 × g. The microspheres were then re-suspended in 0.5 ml KOH and the number present in the hemisphere was calculated by counting 50 µl of the suspension in quadruplicate on a light microscope by two persons blinded to the experimental conditions.

2.6. Cellular localization of BDNF

Chloral-anaesthetized rats were transcardially perfused with saline and then with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5). The removed brains were postfixed in the same fixative for 1 h and transferred 48 h in 20% sucrose solution in 0.4 M phosphate buffer. They were frozen in isopentane at –40 °C and stored at –80 °C. Multiple sections (20 µm, starting +1.7 mm to bregma and extending back to –4.0 mm to bregma) were cut in a cryostat (HM550, Microm, Francheville, France) at –20 °C and collected on SuperFrost Plus slides. After rinsing in PBS (pH 7.4), the sections were treated 10 min with proteinase K (10 µg/ml) at room temperature (RT) for antigen retrieval and incubated for 2 h in PBS containing 10% goat serum (GS), 0.1% Triton X-100, 0.2% Tween 20 in order to block the non-specific binding sites. Thereafter, the sections were incubated for 3 d at 4 °C in the same medium containing the rabbit polyclonal antibody recognizing BDNF (dilution 1:100) in the presence of monoclonal antibodies recognizing either OX-42 (dilution 1:100), GFAP (dilution 1:500) or NeuN (dilution 1:500) in order to assess 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 3 h (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 containing 1.5 µg/ml DAPI (Vectashield Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, USA) and observed with a confocal microscope (LEICA SP2, AOBS). BDNF expression in the different cerebral cells was graded on a scale from 0 to 3 (0 no expression; 1 mild expression; 2 moderate expression; 3 high expression) by two persons blinded to the experimental conditions.

2.7. Measurement of GFAP expression

Immunoblot analysis was performed on brain homogenates used for the measurement of BDNF levels. Equal amounts of total proteins (10 µg/lane) were

dissolved in 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue and were heated at 85°C for 10 min. Proteins were separated on 10% SDS-PAGE according to the method of Laemmli (1970). Proteins were electrophoretically transferred onto PVDF membrane (0.2 µm pore size) in cold transfer buffer [25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glycine, and 20% methanol]. The blots were incubated overnight at 4 °C in 5% non-fat dry milk in TBS buffer [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 RT with the monoclonal anti-GFAP antibody (1/2000) and for 90 min with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1/50000). The membranes were stripped and probed with a mouse monoclonal anti-β-actin antibody (1/5000; A-5441, Sigma) used as an internal control. Protein-antibody complexes were visualized using the enhanced chemiluminescence Western blotting detection system (ECL⁺, GE Healthcare). The band densities were determined by scanning densitometry (GS-800, Bio-Rad Laboratories). Data were expressed as arbitrary units.

2.8. Experimental groups

The first set of experiments was designed for the assessment of the relationship between BDNF levels and neuronal death severity, and the impact of embolization on hemispheric BDNF production. Rats ($n = 74$) were injected with 2000, 3000 or 4000 microspheres in order to induce a large panel of stroke severities. Eleven rats died during the surgical procedure and additional rats ($n = 23$) died overnight. Surviving rats ($n = 51$) were euthanized 4 h, 24 h, or 8 d after embolization. BDNF levels were measured in 4 h-, 24 h- and 8 d-embolized rats (groups E 4 h, E 24 h, E 8 d, respectively, $n = 10$ for each group) selected from their degree of brain embolization in order to obtain a similar range of neuronal death severity (i.e. of degree of embolization) in the three groups of rats. As shown in Fig. 1, the repartition of rats according to their degree of embolization was not different between groups. The individual degree of embolization was plotted against the individual BDNF levels or GFAP expression. BDNF levels were also measured in intact rats ($n = 7$).

The second set of experiments was performed to assess the impact of stroke on BDNF cellular expression. Based on the results of the first experiment showing that all rats survived after a low degree of embolization, rats were injected with 2000 microspheres ($n = 10$). Then, the animals were euthanized 4 h ($n = 3$), 24 h ($n = 3$) or 8 d ($n = 4$) after embolization. For this experiment, the degree of embolization cannot be determined since these brains were dedicated to the realization of brain sections. Cellular localization of BDNF was also studied in intact rats ($n = 5$).

2.9. Statistical analysis

Hemispheric BDNF levels were expressed as mean $\pm$ standard deviation of n rats. The Kruskal-Wallis non parametric test was used to detect a global difference between groups. If the P value was below 0.05, we performed pairwise comparison between pre-ischemic data and data collected at 4 h, 24 h, or 8 d post-ischemia using the Mann-Whitney U -test and the Bonferroni's test as a post-hoc test. The comparison was significant if $P < 0.016$ (0.05/3 comparisons).

The Kendall rank correlation coefficient (τ) was applied to test the relationship between BDNF levels and the degree of embolization, and between BDNF levels and GFAP expression. The relationship was considered significant if $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Relationship between the individual BDNF levels and degree of embolization

Fig. 2 shows the relationship between BDNF levels and the degree of embolization. For both hemispheres, no relationship

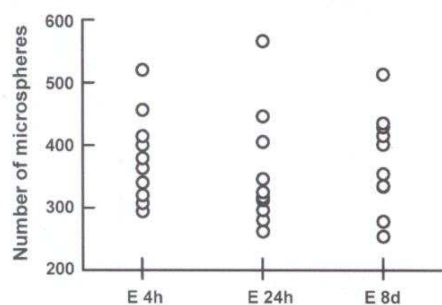


Fig. 1. Individual degree of embolization in 4 h-, 24 h- and 8 d embolized rats. The microspheres were counted in the left hemispheres after injection of 2000, 3000 or 4000 microspheres into the left common carotid artery after ligation of the external carotid artery. Each dot represents one rat (10 rats per group).

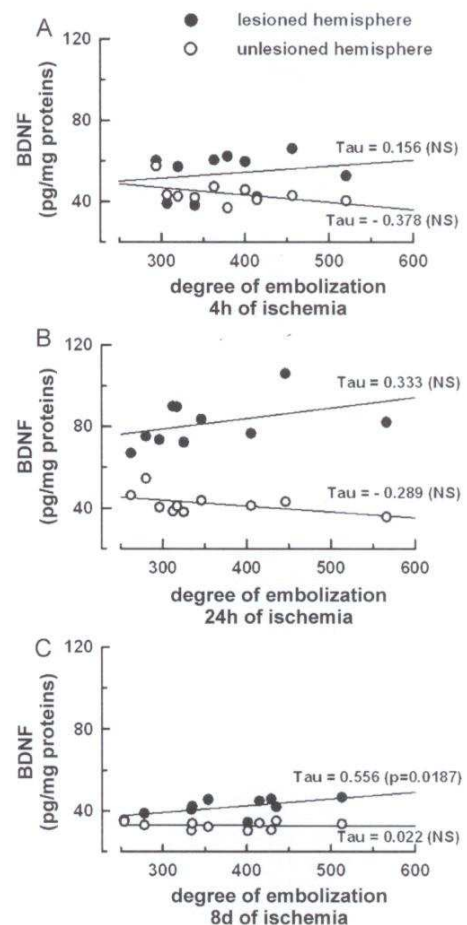


Fig. 2. Relationship between the hemispheric BDNF content and the degree of embolization. The association was assessed in 4 h- (A), 24 h- (B) or 8 d- (C) embolized rats. Each dot represents a rat in which BDNF levels were separately measured in the lesioned (black dot) and the unlesioned (empty dots) hemispheres.

was observed between the two parameters in groups E 4 h (Fig. 2A) and E 24 h (Fig. 2B). In contrast, a positive correlation was observed between BDNF levels of the lesioned hemisphere and the degree of embolization after 8 d of ischemia (group E 8 d, $\tau = 0.556$, $P = 0.0187$, Fig. 2C). Thus, the BDNF content of either the lesioned or the unlesioned hemisphere did not inversely correlate to neuronal death severity whatever the delay after stroke onset.

3.2. Effect of ischemic stroke on BDNF immunoreactivity

In embolized rats, lesions were confined to the hemisphere ipsilateral to the injection site of microspheres and primarily affected the parietotemporal cortex and the thalamostriate areas except in one rat of group E 8 d in which the hippocampus was partly lesioned. Even though the infarction was unilateral, stroke-induced changes in BDNF-immunoreactivity (BDNF-IR) were found in both hemispheres. However, whereas BDNF-IR was restricted to neurons and ependymal cells in the contralateral hemisphere, it extended to endothelial cells and astromicroglia in the ipsilateral hemisphere. Because the cellular pattern of BDNF-IR was independent on the lesions localization, we choose to show micrographs from brain slices passing through a cortical lesion (Figs. 3–5), thus allowing visualization of BDNF-IR changes

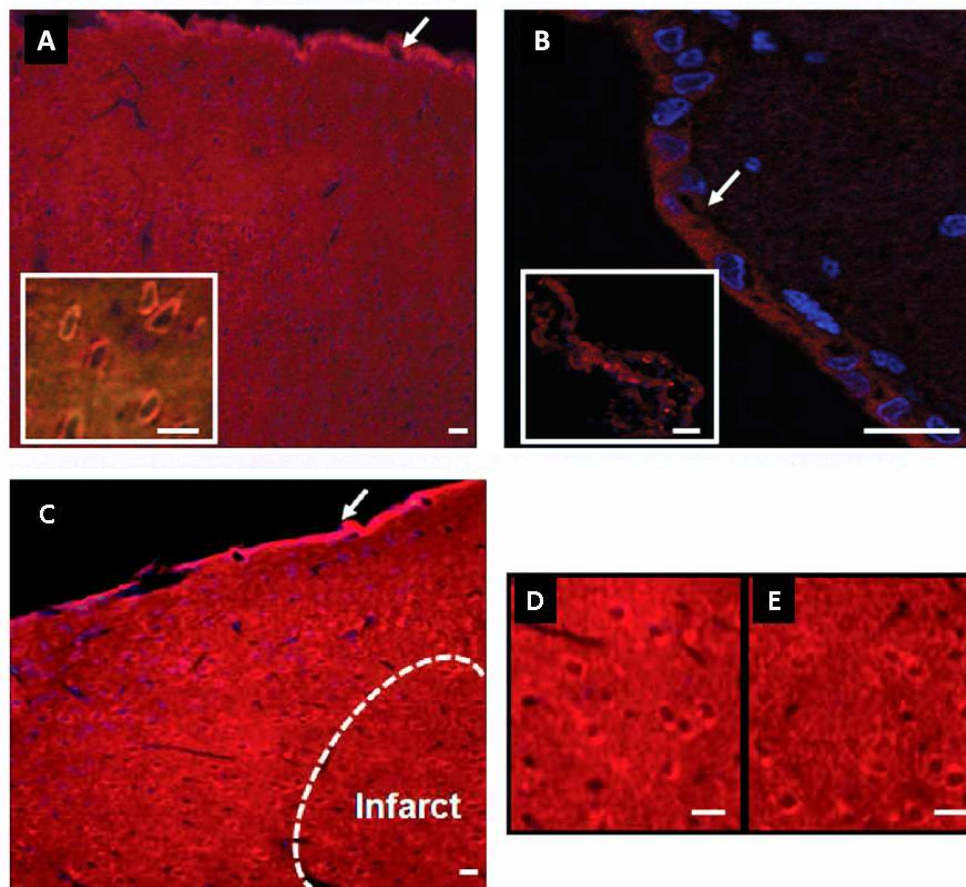


Fig. 3. Representative micrographs of BDNF staining in the presence of DAPI nuclear labeling in intact (A and B) and 4 h-embolized rat (C–E). (A) Moderate BDNF staining of neurons (the cells are NeuN positive as shown in the inset) and of ependymal cells of the pial surface (arrow) in intact rat, (B) ependymal cells of the ventricle wall (arrow) and of choroids plexus (insert) are BDNF positive in intact rat, (C) ependymal cells (arrow) as well as neurons exhibit intense BDNF staining at 4 h post-embolization as compared to intact rat, (D) higher magnification of BDNF staining of neurons around the lesion, (E) higher magnification of BDNF staining of neurons localized inside the lesion. Scale bars = 20 μ m.

occurring at the pial surface. Unlike previous studies that reported a selective neuronal localization of BDNF in adult rat brain (Kawamoto et al., 1996; Schmidt-Kastner et al., 1996), neuronal BDNF expression (Fig. 3A) was also associated with BDNF staining of ependymal cells in intact rats. Not only ependymal cells of the pia (Fig. 3A) but also ependymal cells of the lateral ventricles and of the choroid plexus were BDNF positive (Fig. 3B). Noteworthy, BDNF expression in ependymal cells (without precision on their localization) was previously observed in human brain (Kerschensteiner et al., 1999), and low levels of BDNF mRNA was reported in choroid plexus in rats (Timmusk et al., 1995).

After 4 h of ischemia, BDNF staining was increased in ependymocytes of the pia and neurons (Fig. 3C) localized either around (Fig. 3D) or inside the infarcts (Fig. 3E) as compared to intact rats. A mild BDNF staining was also detected in endothelial cells of arterioles located inside the lesions (not shown).

After 24 h of ischemia (Fig. 4), perilesional neurons and ependymocytes of the pia still exhibited strong BDNF-IR (Fig. 4A). Between 4 h and 24 h post-lesions, changes neither in the number of perilesional neurons positive for BDNF nor in their BDNF-IR intensity were observed. Importantly, neuronal loss in the lesions was near complete at 24 h of ischemia and no residual BDNF-stained neurons were observed within the infarcts at this time. In contrast, endothelial cells of arterioles

confined to the lesions were strongly positive for BDNF (Fig. 4B). Although we did not use specific endothelial marker, the pattern of BDNF staining as well as the size and morphology of nucleus of BDNF positive cells undoubtedly argue for BDNF expression by these cells. Moreover, please note that the cells immediately in contact with the microsphere show an intense BDNF staining (Fig. 4B, insert). In addition, a subset of round-shaped cells positive for the microglia/macrophages marker OX-42 showed BDNF staining. These cells were localized at the inner border of the lesions (Fig. 4C–F).

After 8 d of ischemia, perilesional neurons still exhibited important BDNF-IR (Fig. 5A and B) as compared to intact rats. However, at this time, the neuronal staining was of lower intensity as compared to that observed after 4 h or 24 h of ischemia. BDNF-IR of ependymocytes of the pia was not different from baseline values (see Fig. 3A). Numerous cells positive for BDNF and GFAP were observed around the lesions, around vessels within the lesions and also at the cortical surface (Fig. 5C–F). Of note, the lesions were populated by OX-42 positive cells which were all BDNF negative (Fig. 5G–J).

In the contralateral hemisphere, BDNF staining was above control values in neurons and ependymal cells after 4 h and 24 h of ischemia only (data not shown). However, their staining was found less intense in comparison to the one observed for the corresponding cells in the lesioned hemisphere.

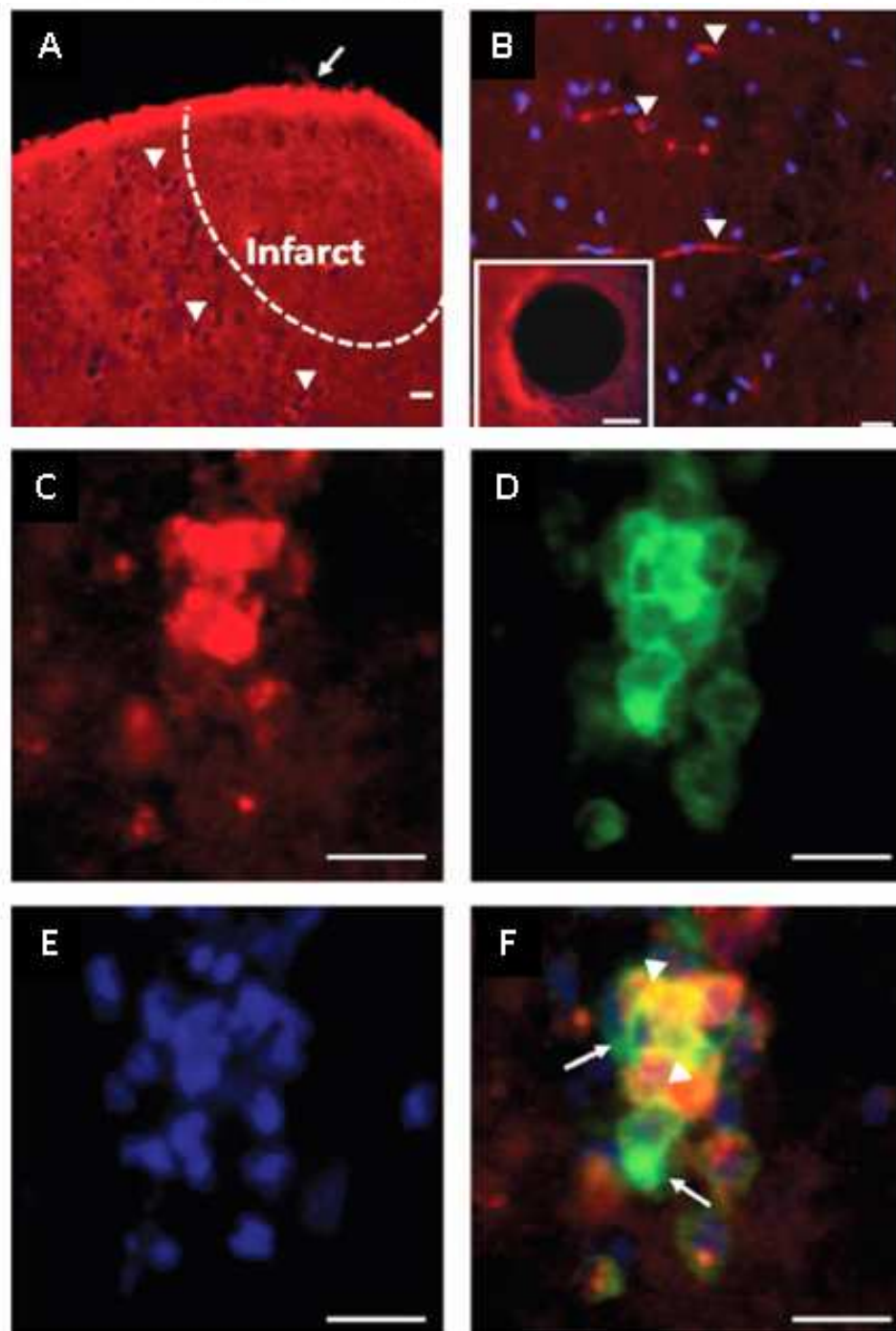


Fig. 4. Representative micrographs of BDNF staining in 24 h-embolized rats (A–F). (A) BDNF staining shows that ependymal cells of the pial surface (arrow) and neurons around the lesion (arrowheads) express BDNF. (B) BDNF staining in the presence of DAPI nuclear labeling shows that microvessels inside the lesion (arrowheads) are strongly positive for BDNF; higher magnification of a microsphere occluding an arteriole reveals an intense BDNF staining of endothelial cells (insert). (C–F) Representative micrographs of the inner border of the lesion from four identical sections. (C) Round-shaped BDNF-immunolabeled cells, (D) these cells are positive for OX-42, (E), DAPI nuclear labeling, (F) overlay of the three fluorochromes (Alexa Fluor 488, Alexa fluor 568 and DAPI) shows that certain (arrowheads) but not all (arrows) microglial cells (OX-42 positive cells) express BDNF. Scale bars = 20 μ m.

3.3. Contribution of neuronal versus non neuronal cells in stroke induced BDNF production

In intact rats, hemispheric BDNF contents (pg/mg of proteins) were 33.30 ± 4.88 for the left hemisphere and 35.21 ± 2.34 for the right hemisphere. As shown in Fig. 6, unilateral embolization

increased BDNF production in both hemispheres. However, the effect was more severe and long-lasting in the lesioned hemisphere.

The time course of BDNF levels in the lesioned hemisphere reveals an increased production of this neurotrophin during the first 4 h of ischemia and the 4–24 h post-stroke interval. During the 24 h–8 d post-stroke period, BDNF production decreased but the

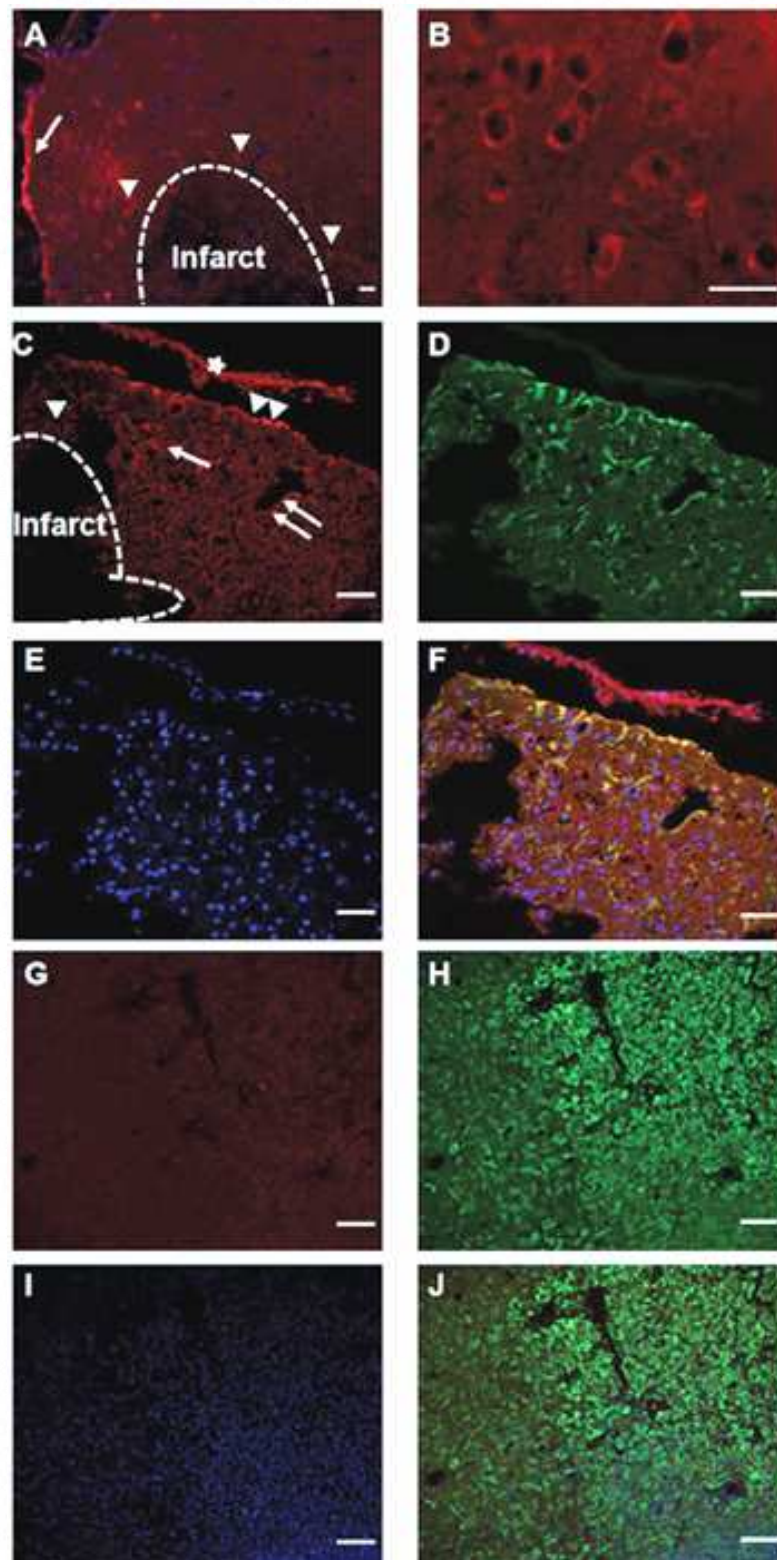


Fig. 5. Representative micrographs of BDNF staining in 8 d-embolized rats (A–J). (A) BDNF staining in the presence of DAPI nuclear labeling of ependymal cells of the pia (arrow) and of neurons localized around the lesion (arrowheads). Note the absence of BDNF positive cells inside the lesion, (B) higher magnification of BDNF-labeled neurons localized around the lesion, (C–F) representative micrographs of the area surrounding the lesion from four identical brain sections, (C) BDNF staining of the pia (asterisk) and numerous cells localized in the parenchyma (among them, cells localized at the cortical surface (double arrowheads), around the lesion with (arrow) or without (arrowhead) stellate shape and close to the vessels (double arrows), (D) most of these cells are GFAP positive, (E) DAPI nuclear labeling, (F) overlay of the three fluorochromes (Alexa Fluor 488, Alexa fluor 568 and DAPI) shows that astrocytes (GFAP positive cells) are positive for BDNF whatever their localization, (G–J). Representative micrographs of the lesion from four identical brain sections, (G) lack of BDNF staining inside the lesion, (H) the lesion is invaded by OX-42 labeled cells, (I) DAPI nuclear labeling, (J) overlay of the three fluorochromes (Alexa Fluor 488, Alexa fluor 568 and DAPI) shows that microglial cells (OX-42 positive cells) do not express BDNF. Scale bar = 20 μ m.

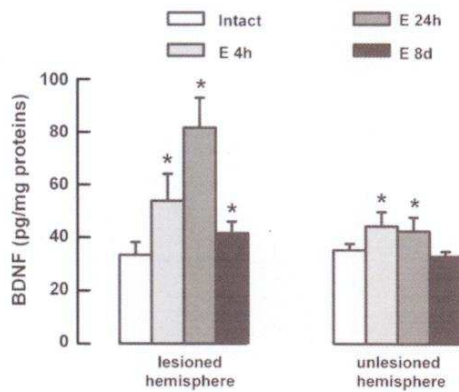


Fig. 6. Effect of stroke on BDNF production. BDNF levels were measured by ELISA in the whole hemispheres of intact rats ($n = 7$) and 4 h-, 24 h-, and 8 d-embolized rats ($n = 10$ for each group), * different from intact rats ($P < 0.016$).

BDNF content in the lesioned hemisphere was still above control values at 8 d of ischemia. These changes were compared to the pattern of BDNF cellular localization and expression intensity which are summarized in the Table 1.

At 4 h of ischemia, BDNF levels were 150% of baseline values. That BDNF production was associated with a marked increase in BDNF expression in neurons around or inside the lesions and in ependymal cells, and also with a mild BDNF expression in endothelial cells as compared to the expression observed in intact rats. Regarding the cellular distribution and intensity of BDNF staining, hemispheric BDNF production mainly originates from an increase in BDNF synthesis by neurons during the first 4 h of ischemia.

During the 4–24 h post-stroke period, an additional and important rise in hemispheric BDNF content occurred in the lesioned hemisphere despite an aggravation of neuronal death. The BDNF levels (pg/mg of proteins) increased from 53.9 ± 10.2 at 4 h to 81.6 ± 11.4 at 24 h. Between these two time points, variation in BDNF staining was neither observed in ependymal cells nor in surviving neurons located around infarctions. Therefore, the important BDNF hemispheric production observed within the 4 h–24 h post-stroke interval was attributable to OX-42-positive and endothelial cells, which both exhibited intense BDNF staining at 24 h but not at 4 h of ischemia. Noteworthy, we can assume that OX-42 staining at 24 h of ischemia was very likely due to local resident microglia since monocytes infiltration has been shown to not occur before 72 h after stroke (Engberink et al., 2008).

The post-stroke 24 h–8 d interval was characterized by an important fall in BDNF levels (from 81.6 ± 11.4 to 41.7 ± 4.3 pg/mg

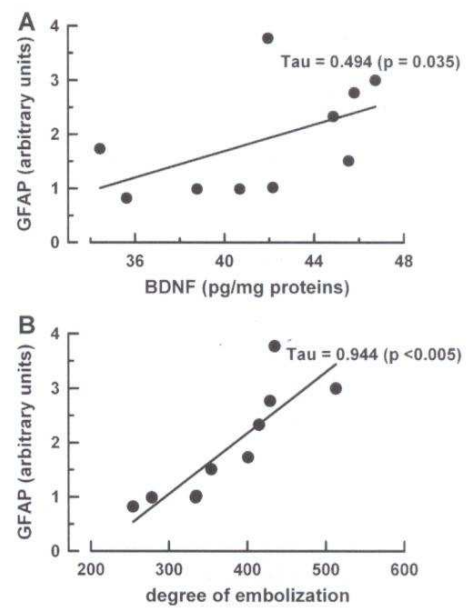


Fig. 7. Relationship between GFAP expression and the hemispheric BDNF content or the degree of embolization. (A) Association between the GFAP expression and the BDNF content or (B) the degree of embolization. The measurements were performed in the embolized hemisphere of 8 d-embolized rats ($n = 10$). Each dot represents a rat.

of proteins) in the lesioned hemisphere, which however remained above baseline values at 8 d of ischemia. At this time and as compared to control values, the increase in the hemispheric BDNF content was associated with an increase in BDNF staining in neurons and a robust BDNF staining in activated astrocytes. Importantly, a positive association was observed between individual BDNF levels and GFAP expression ($\tau = 0.494$, $p = 0.035$, Fig. 7A). Taken together, these data argue for astrocytes as a main source of BDNF in the delayed stage of stroke. In addition, a positive correlation was also obtained between GFAP expression and the degree of embolization ($\tau = 0.944$, $P < 0.005$, Fig. 7B), confirming that astroglial activation correlates with neuronal death severity as already described (Nagai et al., 2010).

Lastly, stroke-induced BDNF production by the unlesioned hemisphere was modest as compared to the lesioned hemisphere and significant only during the first 24 h of stroke (Fig. 6). According to the pattern of BDNF cellular expression in this hemisphere, BDNF overproduction was attributable to neurons and ependymal cells since only these cells showed an elevated BDNF staining as compared to intact rats.

4. Discussion

Using an ischemic stroke model that offers the unique opportunity to assess the relationship between cerebral BDNF production and neuronal death severity, our study provides evidence that both neurons and non neuronal cells contribute to increase BDNF production after stroke and that the implicated-non-neuronal-cells differ according to the delay after stroke onset.

Increases in BDNF levels have been reported in pieces of tissue collected at the infarct or peri-infarct level (Kokaia et al., 1998; Madinier et al., 2009; Sulejczak et al., 2007). However, as BDNF can be transported in the axon in both anterograde or retrograde direction (DiStefano et al., 1992; Reynolds et al., 2000; von Bartheld et al., 1996), changes in BDNF levels in a specific brain area does not necessarily mean changes in BDNF production in

Table 1
Cellular BDNF localization in the lesioned hemisphere.

	BDNF staining			
	Before stroke	After stroke		
	(n=5)	4 h (n=3)	24 h (n=3)	8 d (n=4)
Neurons	+			
Around lesion		+++	+++	++
Within lesion		++	0	0
Ependymal cells	+	++	++	+
Endothelial cells	–	+	+++	–
Microglial cells	–	–	+++	–
Astrocytes	–	–	–	+++

BDNF staining before and after (4 h, 24 h, 8 d) brain embolization, n = number of rats. (0) no surviving neuron, (–) no, (+) mild, (++) moderate, (+++) intense BDNF staining.

that area. For instance, BDNF proteins have been detected in the adult rodent striatum despite the absence of BDNF mRNA (von Bartheld et al., 1996). In our study, BDNF levels were separately measured in the two whole hemispheres. Therefore, changes in hemispheric BDNF levels obligatory sign changes in BDNF production. According to this experimental paradigm, our results show that unilateral ischemic stroke increases BDNF production in both hemispheres even though the effect was found more intense and long lasting in the lesioned hemisphere. Contralateral changes in BDNF synthesis have been poorly investigated after stroke as compared to ipsilateral changes. However, consistent with enhanced BDNF production in areas opposite to the lesion site, increased BDNF mRNA has been reported in the contralateral hippocampus after focal brain ischemia (Arai et al., 1996; Kokaia et al., 1995).

In situ hybridization studies in animal models of stroke have revealed 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 neurons represent the unique source of BDNF after stroke. However, these studies focus on the very acute stage of stroke, and therefore miss the opportunity to detect BDNF mRNA in activated glial cells, which however have shown to express BDNF (Komitova et al., 2006; Madinier et al., 2009; Sato et al., 2009; Sulejczak et al., 2007). Our study provides evidence that both neurons and non neuronal cells produce substantial amount of BDNF after stroke, but that their relative contribution is dependent on the delay after stroke onset. In the first 4 h of stroke, our results show that increase in BDNF production is mainly due to upregulation of BDNF by neurons located inside and at vicinity of the lesions, thus confirming results of *in situ* hybridization studies. Later, the contribution of endothelial cells (microvessels within the lesion) and microglial cells (around lesions) becomes predominant, whereas in a more delayed stage of stroke, BDNF overproduction involves neurons again and astrocytes. To the best of our knowledge, our study is the first to report BDNF upregulation by endothelial cells in the ischemic brain. This result is important regarding the growing interest for the cross-talk between endothelial cells and other cells of the neurovascular unit in the pathophysiology of stroke (Arai et al., 2009). Another exciting new finding of the present study is that ependymal cells respond to an ischemic insult by BDNF upregulation even though their contribution in stroke-induced BDNF production seems to be modest. However, recent studies show that ependymal cell of the lateral ventricles can be activated to generate neuroblasts in the ischemic brain (Carlen et al., 2009). In addition, cellular therapy using ependymal cells could represent a new opportunity since it has been shown that animals transplanted with encapsulated choroid plexus displayed a reduction in both functional deficit and lesion size after stroke (Borlongan et al., 2004a).

Cerebral endogenous BDNF may exert multiple beneficial effects after an ischemic insult. For instance, BDNF has been identified as a neuroprotective agent (Schabitz et al., 1997; Wu, 2005), a promoter of angiogenesis (Kermani and Hempstead, 2007), neurogenesis (Keiner et al., 2009; Schabitz et al., 2007), and synaptic plasticity (Waterhouse and Xu, 2009). The present study, demonstrating the implication of non neuronal cells in stroke-induced BDNF neosynthesis, identifies these cells as potential targets of strategies aimed at improving recovery after stroke. In this context, 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 innovative option to potentiate post-stroke neuroregenerative responses. Similarly, the BDNF synthesis by endothelial cells may be also beneficial since BDNF produced by these cells may guide the migration of neuronal

precursors toward the lesion (Snayyan et al., 2009) and has been proposed to be a trophic link between endothelium and neuronal survival (Guo et al., 2008). Lastly, 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 and Vinters, 2010). Importantly, according to the relatively long delay for BDNF production by astrocytes after stroke, interventions targeting these cells offer the advantage to have a large therapeutic window.

The factors that control BDNF production by non neuronal cells after stroke are not well elucidated *in vivo*. However, evidences from *in vitro* studies using cells cultured in conditions mimicking ischemia reveal that these factors are multiple. For instance, astrocytes express BDNF when dopamine, glutamate or cytokines are added to the culture medium (Jean et al., 2008; Miklic et al., 2004; Saha et al., 2006). Human cerebral endothelial cells produce substantial amount of BDNF when exposed to pro-inflammatory conditions and to reduced oxygen availability (Bayas et al., 2002; Wang et al., 2006), and microglial cells respond to media from damaged neurons by BDNF upregulation (Lai and Todd, 2008). Lastly, choroids plexus produce BDNF when transplanted into the ischemic lesion (Borlongan et al., 2004b). Although not investigated directly here, our results suggest that the primarily signal involved in the control of BDNF production originates from ischemically injured neurons. Indeed, our results report similar individual BDNF levels after 4 h or 24 h of ischemia despite large difference in degree of embolization between rats. More convincing, the degree of embolization and BDNF levels were positively correlated at 8 d of ischemia. These data support the idea that higher is the stroke severity in term of neuronal death, the more important is the BDNF production by non neuronal cells. Assuming that BDNF upregulation represents a compensatory mechanism coping with neuronal death, interventions aimed at decreasing neuronal death (neuroprotection) might therefore be not as beneficial as expected because such strategies might decrease BDNF production by non neuronal cells. Although provocative, this idea is in concordance with the plethora of negative clinical trails with neuroprotective drugs in stroke patients (O'Collins et al., 2006). The possibility that non neuronal cells can compensate for neuronal death may also explain why an extensive brain lesion may be associated with less functional deficit than a small lesion (Irlle, 1987) and why motor skill performance with the limb ipsilateral to the ischemic lesion is better in rats with larger lesion size (Allred and Jones, 2004).

In conclusion, our results suggest that more attention should be given to ependymal, endothelial cells, microglia and astrocytes in the design of strategies aimed at improving stroke recovery through BDNF-related mechanisms. Elaboration of such therapeutic options requires a better understanding of the *in vivo* mechanisms controlling extra-neuronal BDNF upregulation after ischemic stroke.

Acknowledgments

We thank Dr. Christine Arnould for her technical assistance at the microscopy center, INRA, Dijon. This work was financially supported by Burgundy and the Faculty of Medicine of Dijon.

References

- Allred, R.P., Jones, T.A., 2004. Unilateral ischemic sensorimotor cortical damage in female rats: forelimb behavioral effects and dendritic structural plasticity in the contralateral homotopic cortex. *Exp. Neurol.* 190, 433–445.

- Arai, K., Jin, G., Navaratna, D., Lo, E.H., 2009. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke. *FEBS J.* 276, 4644–4652.
- 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.
- Batchelor, P.E., Liberatore, G.T., Wong, J.Y., Porritt, M.J., Frerichs, F., Donnan, G.A., Howells, D.W., 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.
- Bayas, A., Hummel, V., Kallmann, B.A., Karch, C., Toyka, K.V., Rieckmann, P., 2002. Human cerebral endothelial cells are a potential source for bioactive BDNF. *Cytokine* 19, 55–58.
- Borlongan, C.V., Skinner, S.J., Geaney, M., Vasconcellos, A.V., Elliott, R.B., Emerich, D.F., 2004. CNS grafts of rat choroid plexus protect against cerebral ischemia in adult rats. *Neuroreport* 15, 1543–1547.
- Borlongan, C.V., Skinner, S.J., Geaney, M., Vasconcellos, A.V., Elliott, R.B., Emerich, D.F., 2004. Intracerebral transplantation of porcine choroid plexus provides structural and functional neuroprotection in a rodent model of stroke. *Stroke* 35, 2206–2210.
- Bralet, A.M., Beley, A., Beley, P., Bralet, J., 1979. Brain edema and blood–brain barrier permeability following quantitative cerebral microembolism. *Stroke* 10, 34–38.
- Carlen, M., Meletis, K., Goritz, C., Darsalia, V., Evergren, E., Tanigaki, K., Amendola, M., Barnabe-Heider, F., Yeung, M.S., Naldini, L., Honjo, T., Kokaia, Z., Shupliakov, O., Cassidy, R.M., Lindvall, O., Frisen, J., 2009. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat. Neurosci.* 12, 259–267.
- 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.
- Chen, J., Zhang, C., Jiang, H., Li, Y., Zhang, L., Robin, A., Katakowski, M., Lu, M., Chopp, M., 2005. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 281–290.
- Cohen-Cory, S., Kidane, A.H., Shirkey, N.J., Marshak, S., 2010. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev. Neurobiol.* 70, 271–288.
- 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, 473–476.
- Cowsansage, 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.
- Demougeot, C., Garnier, P., Mossiat, C., Bertrand, N., Giroud, M., Beley, A., Marie, C., 2001. N-Acetylaspartate, a marker of both cellular dysfunction and neuronal loss: its relevance to studies of acute brain injury. *J. Neurochem.* 77, 408–415.
- DiStefano, P.S., Friedman, B., Radziejewski, C., Alexander, C., Boland, P., Schick, C.M., Lindsay, R.M., Wiegand, S.J., 1992. The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron* 8, 983–993.
- Engberink, R.D., Blezer, E.L., Hoff, E.I., van der Pol, S.M., van der Toorn, A., Dijkhuizen, R.M., de Vries, H.E., 2008. MRI of monocyte infiltration in an animal model of neuroinflammation using SPIO-labeled monocytes or free USPIO. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 841–851.
- Greenberg, M.E., Xu, B., Lu, B., Hempstead, B.L., 2009. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J. Neurosci.* 29, 12764–12767.
- Guo, S., Kim, W.J., Lok, J., Lee, S.R., Besancon, E., Luo, B.H., Stins, M.F., Wang, X., Dedhar, S., Lo, E.H., 2008. Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial cells and neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7582–7587.
- Irlé, E., 1987. Lesion size and recovery of function: some new perspectives. *Brain Res.* 434, 307–320.
- Jean, Y.Y., Lercher, L.D., Dreyfus, C.F., 2008. Glutamate elicits release of BDNF from basal forebrain astrocytes in a process dependent on metabotropic receptors and the PLC pathway. *Neuron Glia Biol.* 4, 35–42.
- Kawamoto, Y., Nakamura, S., Nakano, S., Oka, N., Akiyuchi, I., Kimura, J., 1996. Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience* 74, 1209–1226.
- 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.
- Kermani, P., Hempstead, B., 2007. Brain-derived neurotrophic factor: a newly described mediator of angiogenesis. *Trends Cardiovasc. Med.* 17, 140–143.
- Kerschensteiner, M., Gallmeier, E., Behrens, L., Leal, V.V., Misgeld, T., Klinkert, W.E., Kolbeck, R., Hoppe, E., Oropeza-Wekerle, R.L., Bartke, I., Stadelmann, C., Lassmann, H., Wekerle, H., Hohlfeld, R., 1999. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J. Exp. Med.* 189, 865–870.
- 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.
- Kokaia, Z., Andsberg, 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.
- Kokaia, Z., Zhao, Q., Kokaia, M., Elmer, E., Metsis, M., Smith, M.L., Siesjö, 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.
- 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.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lai, A.Y., Todd, K.G., 2008. Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia* 56, 259–270.
- Lipsky, R.H., Marini, A.M., 2007. Brain-derived neurotrophic factor in neuronal survival and behavior-related plasticity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1122, 130–143.
- 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.
- Mattson, M.P., 2008. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1144, 97–112.
- Miklic, S., Juric, D.M., Carman-Krzan, M., 2004. Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22, 119–130.
- Nagai, N., Kawao, N., Okada, K., Ishida, C., Okumoto, K., Ueshima, S., Suzuki, Y., Umemura, K., Matsuo, O., 2010. Initial brain lesion size affects the extent of subsequent pathophysiological responses. *Brain Res.* 1322, 109–117.
- Nagamoto-Combs, K., McNeal, D.W., Morecraft, R.J., Combs, C.K., 2007. Prolonged microgliosis in the rhesus monkey central nervous system after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 24, 1719–1742.
- Nagappan, G., Lu, B., 2005. Activity-dependent modulation of the BDNF receptor *TrkB*: mechanisms and implications. *Trends Neurosci.* 28, 464–471.
- O'Collins, V.E., Macleod, M.R., Donnan, G.A., Horky, L.L., van der Worp, B.H., Howells, D.W., 2006. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann. Neurol.* 59, 467–477.
- 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, 1490–1495.
- Reynolds, A.J., Bartlett, S.E., Hendry, I.A., 2000. Molecular mechanisms regulating the retrograde axonal transport of neurotrophins. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 33, 169–178.
- Rickhag, M., Teilmann, M., Wieloch, T., 2007. Rapid and long-term induction of effector immediate early genes (BDNF, *Neurotin* and *Arc*) in peri-infarct cortex and dentate gyrus after ischemic injury in rat brain. *Brain Res.* 1151, 203–210.
- Saha, R.N., Liu, X., Pahan, K., 2006. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF- α : a case for the neuroprotective role of cytokine. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 1, 212–222.
- Sato, Y., Chin, Y., Kato, T., Tanaka, Y., Tozuka, Y., Mase, M., Ageton, 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, 71–78.
- 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, 500–506.
- 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, 2165–2172.
- Schmidt-Kastner, R., Humpel, C., Wetmore, C., Olson, L., 1996. Cellular hybridization for BDNF, *trkB*, and NGF mRNAs and BDNF-immunoreactivity in rat forebrain after pilocarpine-induced status epilepticus. *Exp. Brain Res.* 107, 331–347.
- Snappy, M., Lemasson, M., Brill, M.S., Blais, M., Massouh, M., Ninkovic, J., Gravel, C., Berthod, F., Gotz, M., Barker, P.A., Parent, A., Saghatelian, A., 2009. Vascularization guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J. Neurosci.* 29, 4172–4188.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V., 2010. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35.
- Sulejczak, D., Ziemlinska, 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, 1362–1377.
- Timmusk, T., Mudo, G., Metsis, M., Belluardo, N., 1995. Expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors in the rat choroid plexus and dura mater. *Neuroreport* 6, 1997–2000.
- Uchida, H., Yokoyama, H., Kimoto, H., Kato, H., Araki, T., 2010. Long-term changes in the ipsilateral substantia nigra after transient focal cerebral ischaemia in rats. *Int. J. Exp. Pathol.* 91, 256–266.
- Vaynman, S., Ying, Z., Gomez-Pinilla, F., 2004. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2580–2590.
- von Bartheld, C.S., Byers, M.R., Williams, R., Bothwell, M., 1996. Anterograde transport of neurotrophins and axodendritic transfer in the developing visual system. *Nature* 379, 830–833.

- Wang, H., Ward, N., Boswell, M., Katz, D.M., 2006. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from brain microvascular endothelial cells. *Eur. J. Neurosci.* 23, 1665–1670.
- 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.
- Wu, D., 2005. Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins. *NeuroRx* 2, 120–128.
- 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, 177–184.

II- Etude 2 : Taux cérébraux et circulant du BDNF après une ischémie cérébrale chez le rat

Publication originale : Circulating and brain BDNF levels in stroke rats. Relevance to clinical studies.

Béjot Y, Mossiat C, Giroud M, Marie C.

En révision dans *PlosOne*

A- Objectifs de l'étude

L'interprétation des taux circulants de BDNF chez les patients victimes d'un AVC a été jusqu'à présent faite sur la base de données expérimentales montrant que l'ischémie cérébrale augmente les taux cérébraux de BDNF (cf tableaux 2 et 3) et qu'il existe une association entre les taux circulants et cérébraux de BDNF (Karege et al., 2002 ; Rasmussen et al. 2009). Cependant, l'effet de l'ischémie cérébrale sur les taux circulants n'est pas connu car les taux avant ischémie ne sont pas disponibles. De plus, l'existence d'une association entre les taux circulants et cérébraux de BDNF est controversée et n'a jamais été établie après ischémie.

Ainsi, l'objectif de cette étude était de répondre à deux questions :

- L'ischémie cérébrale qui augmente les taux cérébraux de BDNF est-elle associée à une modification des taux circulants ?
- Les taux circulants de BDNF sont-ils le reflet des taux cérébraux de BDNF ?

B- Méthodes

L'ischémie était induite chez le rat par embolisation unilatérale du cerveau avec un nombre variable de microsphères afin de mimer le large panel de sévérité observé en clinique (cf méthodologie). Le sang était prélevé chez le même rat avant et après (4h, 24h, 8j) embolisation en vue d'un dosage du BDNF plasmatique et sérique. Le BDNF cérébral était mesuré dans le cerveau entier qui était prélevé 4h, 24h ou 8j après embolisation ainsi que chez des rats contrôles. Le taux de BDNF était déterminé selon une technique ELISA. Comme

dans l'étude précédente, les rats inclus étaient sélectionnés à partir de leur degré d'embolisation. Ainsi, la distribution du degré d'embolisation n'était pas différente entre les groupes 4h, 24h et 8j d'ischémie, mais chaque groupe comportait un large et même panel de sévérité d'ischémie.

C- Principaux résultats

- Les taux moyennés de BDNF circulant (plasma et sérum) mesurés après ischémie ne sont pas significativement différents des taux pré-ischémiques.
- Les taux circulants de BDNF sont indépendants du degré d'embolisation sauf au temps 4h où il existe une corrélation positive entre les taux plasmatiques du BDNF et le degré d'embolisation.
- Les taux circulants du BDNF après une ischémie ne reflètent pas les taux présents dans le cerveau.

Circulating and brain BDNF levels in stroke rats.

Relevance to clinical studies

Yannick Béjot^{1,2,3}, Claude Mossiat¹; Maurice Giroud^{1,2,3}; Christine Marie¹

1: U887 Motricity-plasticity, Faculté de Pharmacie, University of Burgundy, Dijon, France.

2: Department of Neurology, University Hospital, Dijon F-21000 France

3: Dijon Stroke Registry, EA 4184, Dijon F-21000 France

Corresponding author:

Dr Yannick Béjot

INSERM U887 Motricité-Plasticité, Faculté de Pharmacie, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, BP 87900, 21079 Dijon, France.

Phone: +33 (0)3 80 39 32 25.

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

E-Mail: ybejot@yahoo.fr

ABSTRACT

Background: Whereas brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels are measured in the brain in animal models of stroke, neurotrophin levels in stroke patients are measured in plasma or serum samples. The present study was designed to investigate the meaning of circulating BDNF levels in stroke patients.

Methods and Results: Unilateral ischemic stroke was induced in rats by the injection of various numbers of microspheres into the carotid circulation in order to mimic the different degrees of stroke severity observed in stroke patients. Blood was serially collected from the jugular vein before and after (4h, 24h and 8d) embolization and the whole brains were collected at 4, 24h and 8d post-embolization. Rats were then selected from their degree of embolization, so that the distribution of stroke severity in the rats at the different time points was large but similar. Using ELISA tests, BDNF levels were measured in plasma, serum and brain of selected rats. Whereas plasma and serum BDNF levels were not changed by stroke, stroke induced an increase in brain BDNF levels at 4h and 24h post-embolization, which was not correlated with stroke severity. Individual plasma BDNF levels did not correlate with brain levels at any time point after stroke but a weak but a positive correlation was observed between individual plasma BDNF levels and stroke severity at 4h post-embolization.

Conclusion: Circulating BDNF levels do not mirror brain BDNF levels after stroke, and severe stroke is associated with high plasma BDNF in the very acute stage.

Introduction

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which is mainly synthesized by neurons, is present in large amounts in the adult brain where it plays a crucial role in plasticity and function [1]. Blood also contains BDNF, which is at a higher concentration in serum than in plasma since platelets release BDNF during the clotting process [2]. Indeed, platelets which cannot synthesize BDNF are rich in BDNF because they are able to take up the BDNF present in plasma. However, the cellular source of the BDNF present in plasma is not known. BDNF may be secreted into the plasma by endothelial or circulating immune cells [3-6]. From the evidence of parallel changes in serum and cortical brain BDNF during postnatal development in rats [7], the brain has been assumed to be an additional source of the BDNF present in plasma. Nevertheless, recent studies have shown that changes in regional brain BDNF levels are not associated with respective changes in plasma or serum [8-10].

Brain BDNF has been extensively studied in animal models of ischemic stroke. The studies consistently showed that brain BDNF levels increased after stroke [11-13], suggesting that BDNF promoted post-lesional plasticity [12, 14, 15]. A few studies have focused on BDNF in stroke patients [16-19]. In these studies, neurotrophin levels were measured in blood samples. In the interpretation of circulating BDNF levels it was assumed that BDNF levels increased in the brain of stroke patients as observed in animals and that circulating BDNF levels mirrored brain BDNF levels. However, BDNF levels have never been measured in post-mortem brains of stroke patients. Moreover, an unresolved but important question is whether circulating BDNF levels are modified by stroke. Indeed, circulating BDNF levels before hospital admission are unknown in patients, and there are no studies on circulating BDNF levels in animal models of stroke.

In order to help the interpretation of circulating BDNF levels in stroke patients, we measured BDNF levels in plasma, serum, and brain before and up to 8 days after the induction of embolic stroke in rats. This study, which is the first to document circulating BDNF levels in an animal model of stroke, was designed to answer the following questions: 1) does stroke induce changes in circulating BDNF levels? 2) do circulating BDNF levels mirror brain BDNF levels after stroke?

Methods

Ethics statement:

All experimental procedures were performed on laboratory animals in accordance with institutional guidelines for the care and use of laboratory animals and were approved by an official committee (French Department of Agriculture guidelines, licence 1308).

Adult male Wistar rats (290-350 g) were housed five per cage at 21°C in an artificial 12-h light and 12-h dark cycle with lights on at 7 am, and food and water *ad libitum*.

1) Induction of ischemic stroke

Multifocal infarction of the left hemisphere was induced in the rats by injection into the left carotid circulation of 50 μ m-calibrated microspheres (carbonized microspheres, 3M, Cergy-Pontoise, France), a model that is routinely used in our laboratory [13, 20-24]. In order to mimic the different degrees of stroke severity observed in patients, we chose this model that offers the unique opportunity to modulate stroke severity voluntarily by changing the number of injected microspheres, and that results in increased BDNF content of both hemispheres, but with a greater and more sustained increase in the lesioned than in the unlesioned hemisphere [13]. Animal death induced by embolization is in proportion with the number of injected microspheres and occurs mainly overnight after embolization. Briefly, after anaesthesia with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) and definitive occlusion of the external carotid artery in order to prevent embolization of extracerebral tissue, a suspension of 2000, 3000 or 4000 microspheres in polyvinylpyrrolidone (20% in water) was injected (0.3 ml for 25-30s) into the left common carotid artery. Then, the artery was definitively occluded. The embolized rats were assigned into one of the three time groups (“stroke 4h”, “stroke 24h” and “stroke 8d”) according to the delay (4h, 24h and 8d) between embolization and brain removal. Each group included rats embolized with 2000, 3000 and 4000 microspheres.

2) Preparation of brain samples

The brains were collected after chloral hydrate anaesthesia followed by transcardial perfusion with saline in order to flush blood out of the cerebral vasculature. The cerebellum, hypothalamus and mesencephalon were discarded. The remaining hemispheres were homogenized in 7 volumes with ice cold buffer (pH 7.4) containing trizma base (100

mmol/L), NaCl (150 mmol/L), EGTA (1 mmol/L), triton (1%) and 1% cocktail of protease inhibitors. After centrifugation, tissue pellets were kept to assess the degree of embolization and supernatants were stored at -80°C until measurement of BDNF levels.

3) *Preparation of blood samples*

Blood was withdrawn (by direct venous puncture) from the jugular vein, a vein that collects blood from the entire brain, before and after (4h, 24h, 8d) embolization in the same rats. Two, 3 or 4 samples (1 ml each) were serially collected according to the time group of the stroke rats. The first and last samples were collected under chloral anaesthesia just before embolization and just before removal of the brain. Intermediate samples, if present, were collected under short-term halothane anaesthesia in order to reduce the overall duration of the anaesthesia. As the circadian rhythm may influence circulating BDNF levels [25], blood samples were always collected between 10 am and 2 pm. The blood was collected into sampling tubes and centrifuged to obtain serum or heparin-anticoagulated plasma. The plasma and serum were then divided into aliquots and stored at -80°C until BDNF measurements.

4) *Assessment of the degree of embolization*

Stroke severity was assessed from the degree of cerebral embolization as different clinical markers of stroke severity including vasogenic oedema, depletion in the neuronal marker N-acetyl-aspartate, and acute neurological deficit correlate with the degree of cerebral embolization [20-22]. In order to quantify the degree of cerebral embolization, the centrifugation pellets of brain tissue were dissolved in 5 ml of 20% KOH and centrifuged (500 g). The microspheres were then re-suspended in 0.5 ml KOH, and counted in triplicate in 50 µl of the suspension by a person blinded to the experimental conditions. A light microscope was used to count the microspheres.

5) *BDNF measurement*

BDNF levels were determined with a commercial sandwich ELISA kit (ChemiKineTM, Cat. No. CYT306, MERCK MILLIPORE) according to the manufacturer's instructions. Supernatants of brain homogenates and serum samples were diluted (1/10, v/v) in the homogenization buffer (see above for its composition) and in TRIS buffer (pH 7.4). The diluted samples (50µL) were again diluted (1/2, v/v) directly on the plate in a buffer provided by the kit. In contrast, plasma samples were not diluted (100 µL of plasma into each well). All

assays were performed in duplicate. Brain BDNF levels were expressed as mg/g of fresh tissue and circulating BDNF levels as ng/mL

6) *Statistical analysis*

Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using non-parametric tests. The Kruskal Wallis test followed by the Mann–Whitney test was used to detect differences between groups of rats, and the Friedman’s test followed by the Willcoxon’s test to detect differences within a given group. The Bonferroni’s procedure was used to reduce the risk I error. The Spearman’s rank correlation coefficient (r_s) was calculated to examine the dependence between two variables. Significance was set at $p < 0.05$.

Results

Embolized rats (n=81) were divided into the following groups: “stroke 4h” (n=15), “stroke 24h” (n=26), “stroke 8d” (n=20) and “stroke 8d_s” (n=20). In the first three groups, blood samples were treated in order to obtain plasma while in the last group blood samples were treated in order to obtain serum. Serum and plasma BDNF levels were collected in separate groups of rats in order to avoid excessive blood withdrawal in a given rat. No mortality was observed in group “stroke 4h”. In contrast, mortality reached 54% (14/26) in group “stroke 24h” (2 rats died under halothane anaesthesia and 12 rats from embolization), 40% (8/20) in group “stroke 8d” (1 rats died during halothane anaesthesia and 7 rats from embolization) and 40% (8/20) in group “stroke 8d_s” (2 rats died during halothane anaesthesia and 6 rats from embolization). In each group, we then selected rats from the number of microspheres found in their brain so that the distribution of stroke severity was large but similar among groups. Accordingly, a certain number of rats were excluded from further experiments. Finally, 10 rats per group were selected, and the number of microspheres expressed as mean $\pm$ SD (minimal-maximal value) was 476 ± 83 (328- 615) in the “stroke 4h” group, 412 ± 122 (288- 618) in the “stroke 24h” group, 413 ± 97 (271-554) in the “stroke 8d” group, and 368 ± 82 (242-487 for range) in the “stroke 8d_s” group. It was not surprising that the maximum degree of cerebral embolization was higher in groups “stroke 4h” and “stroke 24h” (~600 microspheres) than in groups “stroke 8d” and “stroke 8d_s” (~500 microspheres) since highly embolized rats did not generally survive beyond 24h. However, the distribution of stroke severity was large and similar in each group. BDNF levels were measured in selected

embolized rats and also in intact rats (no surgical procedure but anaesthesia and blood collection on the model of group “stroke 8d”, n=7).

1) Effect of stroke on circulating BDNF levels

The effect of stroke on circulating BDNF levels was assessed from the serial measurement of serum and plasma levels in the groups “stroke 8d_s” (Figure 1) and “stroke 8d” (Figure 2), respectively. In these two groups, the distribution of stroke severity was quite similar (please compare individual degree of embolization between Figure 1 and Figure 2). Stroke did not modify serum BDNF levels (Figure 1A), and individual serum BDNF levels did not correlate with stroke severity at any time point after stroke (Figure 1B). Like serum levels, pre- and post-embolization plasma BDNF levels were not significantly different (Figure 2A). However, a weak but positive correlation was observed between plasma BDNF levels at 4h post-embolization and stroke severity ($r_s = 0.673$, $p=0.019$) (Figure 2B). At other time points, no association was observed between the two parameters. The stroke severity-dependant changes in plasma BDNF levels at 4h post-embolization coincided with the great inter-individual variability in plasma BDNF levels observed at this time point (please compare the standard deviation obtained at 4h, 24h and 8d post-embolization in Figure 2A). Notably, a positive correlation between plasma BDNF levels at 4h post-embolization and the degree of embolization was also found after pooling the groups “stroke 4h”, “stroke 24h” and “stroke 8d” ($n= 30$, $r_s = 0.364$, $p= 0.024$). In these rats, pre- and 4h post-embolization plasma BDNF levels were again not statistically different (22.2 ± 16.5 and 37.8 ± 44.6 ng/mL before and 4h after embolization, $n=30$, NS).

2) Relationship between brain and circulating BDNF after stroke

Figure 3A showed brain BDNF levels in intact and embolized rats (groups “stroke 4h”, “stroke 24h”, and “stroke 8d”). Stroke significantly increased brain BDNF levels at 4h and 24h post-embolization (Figure 3A), but the levels did not correlate with the degree of embolization in any of the three time groups of stroke rats (Figure 3B). When plasma BDNF levels were plotted against brain BDNF levels measured at the same time (4h, 24h or 8d) after stroke we did not find any correlation between the two parameters (Figure 4).

As expected, no difference in brain BDNF levels (ng/g) was observed between groups “stroke 8d” (3.74 ± 0.22) and “stroke 8d_s” (3.36 ± 0.68). When serum BDNF levels were plotted against brain BDNF levels, both parameters being measured at day 8 post-embolization, we

did not find any correlation between the two parameters ($n=10$, $r_s= 0.139$, NS, data not shown).

Discussion

BDNF levels were measured in the whole brain and in the blood (plasma and serum) collected from the jugular vein in rats subjected to different severities of unilateral embolic stroke. The measurements were made before stroke and up to 8d after stroke. The results report an increase in brain BDNF levels at 4 and 24h after stroke onset, which, however, was not accompanied by parallel changes in plasma or serum.

In the present study, embolic stroke was induced by the injection into the left carotid circulation of 50 μm -calibrated microspheres, a model that results in severe ischemia of the left hemisphere and formation of multiple infarcts that primarily affects the parieto-temporal cortex, the hippocampus and the thalamostriate areas [21, 22]. This model is unique because it allows inducing a large but controlled distribution of degrees of stroke severity by changing the number of injected microspheres. The present results showed that brain BDNF content increased after embolization and that the increase was not correlated with the degree of embolization. The lack of correlation between the two parameters supports our previous study revealing that the induction of BDNF synthesis in non-neuronal cells and BDNF over-expression by surviving neurons compensate for neuronal death-induced decreases in brain BDNF synthesis [13].

In stroke patients circulating BDNF levels before hospital admission are unknown. Therefore, the effect of stroke on circulating BDNF can only be assessed by comparing BDNF levels in stroke patients with those in healthy subjects. However, difference between the two populations in life style, living environment and indices of metabolic and cardiovascular health, which are determinants of both plasma and serum BDNF levels [26, 27] may be confounding factors. Our present animal study in which BDNF levels were measured before and after embolization in the same rats offers the unique opportunity to directly investigate the effect of stroke on circulating BDNF levels. Our results reveal that stroke did not significantly change plasma BDNF levels when stroke severity was not taken into account. In contrast, a weak but significant positive correlation was observed between

plasma BDNF levels and stroke severity in the acute stage of stroke (4h post-embolization). At the first sight, these data contrast with a study conducted on a small cohort (n=10) of stroke patients [16]. This study reported a remarkable stability in plasma BDNF levels from hospital admission up to 4d as well as a lack of correlation between plasma BDNF levels and the lesion size or the clinical score. However, it is possible that the first blood sample was collected too late in stroke patients ($10.7\text{h} \pm 7.6$ for SD vs 4h post-embolization), thus missing the opportunity to detect stroke severity-dependent changes in plasma BDNF levels in patients. Alternatively, the lack of correlation may be due to a small number of patients with severe stroke (only two patients with a NIHSS >16, data on lesion size were not available). The mechanisms by which plasma BDNF levels at 4h post-embolization are related to stroke severity have not been investigated here. However, the fact that plasma but not brain BDNF correlated with stroke severity supports the hypothesis that the excess of BDNF found in plasma of rats with severe stroke do not originate from the brain. An alternative but still speculative source of BDNF could be the endothelium. Indeed, circulating levels of pro-inflammatory cytokines or markers of oxidative stress at hospital admission have been previously correlated with stroke severity [28, 29]. Beside, when exposed to oxidative stress and pro-inflammatory cytokines endothelial cells synthesize and secrete high amounts of BDNF [3, 5]. Whereas plasma BDNF is taken up by platelets, the elevation of plasma BDNF levels at 4h post-embolization did not lead to an increase in platelet BDNF content as evidenced by the lack of change of BDNF levels in serum after stroke. As BDNF levels are 200 times higher in serum than in plasma (in rats and humans), we suggest that severe stroke-induced elevation in plasma BDNF levels is too low to induce detectable changes in serum. Notably, it has been shown that serum BDNF levels were not associated with lesion size or recovery in stroke patients [17, 18]. Further clinical studies are needed to evaluate the reliability of plasma BDNF as an early biological marker of stroke severity.

The interpretation of circulating BDNF level in stroke patients has been made on the basis of the assumptions that circulating BDNF levels mirror brain BDNF levels. Our study, that is the first to simultaneously measure circulating and brain BDNF levels in stroke rats, reveals that changes in brain BDNF levels induced by stroke were not associated with parallel changes in plasma or serum. Thus, whereas stroke increased brain BDNF levels at 4h and 24h, it did not induce significant changes in plasma or serum. In addition, no correlation was observed between individual circulating and brain BDNF levels. These data clearly indicate

that circulating BDNF levels do not mirror brain levels after stroke regardless the delay after stroke onset, thus challenging the idea that the measurement of circulating BDNF is a reliable way to assess BDNF levels in brain of stroke patients. The corollary is that only post-mortem analysis of the ischemic brain will document the effect of human stroke on brain BDNF levels. Assuming that circulating BDNF levels do not reflect levels present in the brain after stroke, some clinical data may need to be reinterpreted. For instance, the stability in plasma BDNF levels observed in stroke patients [16] remains compatible with increased BDNF levels in the ischemic brain, and differences in serum BDNF levels that have been reported between patients without post-stroke depression (PSD) and PSD patients [18, 19] do not necessarily indicate that increased BDNF production in the brain of PSD patients is compromised.

In conclusion, stroke increases BDNF levels in the whole brain but not in the blood, and high plasma BDNF levels in the very acute stage are associated with severe stroke.

Acknowledgements:

We thank Mr Philip Bastable for reviewing the English and JM Lhubina for technical assistance.

Financial disclosure:

This work was supported by a grant for young research scientists (YB) from the medical school of Dijon as well as by grants from the Burgundy region and from the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM).

The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests:

None

References

- 1) Hu Y and Russek SJ (2008) BDNF and the diseases nervous system: a delicate balance between adaptative and pathological process of gene regulation. *J Neurochem* 105: 1-17.
- 2) Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, et al (2002) Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost* 87: 728-734.
- 3) Bayas A, Hummel V, Kallmann BA, Karch C, Toyka KV, et al (2002) Human cerebral endothelial cells are a potential source for bioactive BDNF. *Cytokine* 19: 55-58.
- 4) Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, et al (2000) Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett* 470: 113-117.
- 5) Wang H, Ward N, Boswell M, Katz DM (2006) Secretion of brain-derived neurotrophic factor from brain microvascular endothelial cells. *Eur J Neurosci* 23: 1665-1670.
- 6) Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, et al (1999) Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 189: 865-870.
- 7) Karege F, Schwald M, Cisse M (2002) Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett* 328: 261-264.
- 8) Mannari C, Origlia N, Scatena A, Del Debbio A, Catena M, et al (2008) BDNF level in the rat prefrontal cortex increases following chronic but not acute treatment with duloxetine, a dual acting inhibitor of noradrenaline and serotonin re-uptake. *Cell Mol Neurobiol* 28: 457-468.
- 9) Elfving B, Plougmann PH, Müller HK, Mathé AA, Rosenberg R, et al (2010) Inverse correlation of brain and blood BDNF levels in a genetic rat model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 13: 563-572.
- 10) Luo KR, Hong CJ, Liou YJ, Hou SJ, Huang YH, et al (2010) Differential regulation of neurotrophin S100B and BDNF in two rat models of depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 34: 1433-1439.
- 11) 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.

- 12) 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: e8101.
- 13) Béjot Y, Prigent-Tessier A, Cachia C, Giroud M, Mossiat C, et al (2011) Time-dependent contribution of non neuronal cells to BDNF production after ischemic stroke in rats. *Neurochem Int* 58: 102-111.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) Di Lazzaro V, Profice P, Pilato F, Dileone M, Florio L, et al (2007) BDNF plasma levels in acute stroke. *Neurosci Lett* 422: 128-130.
- 17) Jimenez I, Sobrino T, Rodriguez-Yanez M, Pouso M, Cristobo M, et al (2009) High serum levels of leptin are associated with post-stroke depression? *Psychological Med* 39: 1201-1209.
- 18) Yang L, Zhang Z, Dingming S, Xu Z, Yuan Y, et al (2011) Low serum BDNF may indicate the development of PSD in patients with acute ischemic stroke. *Int J Geriatr Psychiatry* 26: 495-502.
- 19) Zhou Z, Lu T, Yue X, Zhu W, Ma M, et al (2011) Decreased serum-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with post-stroke depression but not with BDNF gene Val66met polymorphism. *Clin Chem Lab Med* 49: 185-189.
- 20) Bralet AM, Beley A, Beley P, Bralet J (1979) Brain edema and blood-brain barrier permeability following quantitative cerebral microembolism. *Stroke* 10: 34-38.
- 21) Bralet J, Beley P, Jemaa R, Bralet AM, Beley A (1987) Lipid metabolism, cerebral metabolic rate and some related enzyme activity after brain infarction in rats. *Stroke* 18: 418-425.
- 22) Bralet J, Bely P, Bralet AM, Beley A (1983) Comparison of the effects of hypertonic glycerol and urea on brain edema, energy metabolism and blood flow following cerebral microembolism in the rat. Deleterious effect of glycerol treatment. *Stroke* 14: 597-604.

- 23) Millerot E, Prigent-Tessier A, Bertrand N, Faure P, Mossiat C, et al (2005) Serum ferritin in stroke : a marker of increased body iron stores or stroke severity. *J Cereb Blood Flow Metab* 25: 1386-1393.
- 24) Demougeot C, Garnier P, Mossiat C, Bertrand N, Giroud M, et al (2001) N-Acetylaspartate, a marker of both cellular dysfunction and neuronal loss: its relevance to studies of acute brain injury. *J Neurochem* 77: 408-415.
- 25) Begliuomini S, Lenzi E, Ninni F, Casarosa E, Merlini S, et al (2008) Plasma brain-derived neurotrophic factor daily variations in men: correlation with cortisol circadian rhythm. *J Endocrinol* 197: 429-435.
- 26) Bus BA, Molendijk ML, Penninx BJ, Buitelaar JK, Kenis G, et al (2011) Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology* 36: 228-239.
- 27) Golden E, Emilano A, Maudsley S, Windham BG, Carlson OD, et al (2010) Circulating Brain-derived neurotrophic factor and indices of metabolic and cardiovascular health: data from the Baltimore longitudinal study of aging. *Plos One* 5: e10099.
- 28) Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P (2005) Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Rad Biol Med* 39: 841-852.
- 29) Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, et al (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.

Figure 1. Serum BDNF levels after stroke. A) BDNF levels were serially measured before and 4h, 24h, 8d after embolization in the “stroke 8d_s” group (n=10), B) Scatter plot between individual BDNF levels and degree of cerebral embolization according to the time of measurement of BDNF levels after embolization. Data are expressed as mean $\pm$ SD, BE = before embolization, r_s = Spearman’s rank correlation coefficient

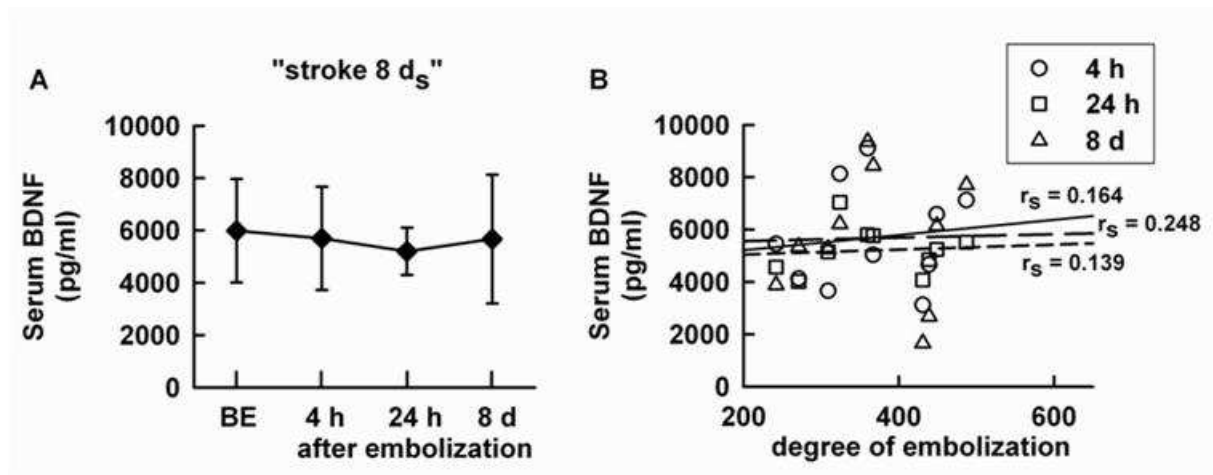


Figure 2. Plasma BDNF levels after stroke. A) BDNF levels were serially measured before and 4h, 24h, 8d after embolization in the “stroke 8d” group (n=10), B) Scatter plot between individual BDNF levels and degree of cerebral embolization according to the time of measurement of BDNF levels after embolization. Data are expressed as mean $\pm$ SD, BE = before embolization, r_s = Spearman’s rank correlation coefficient

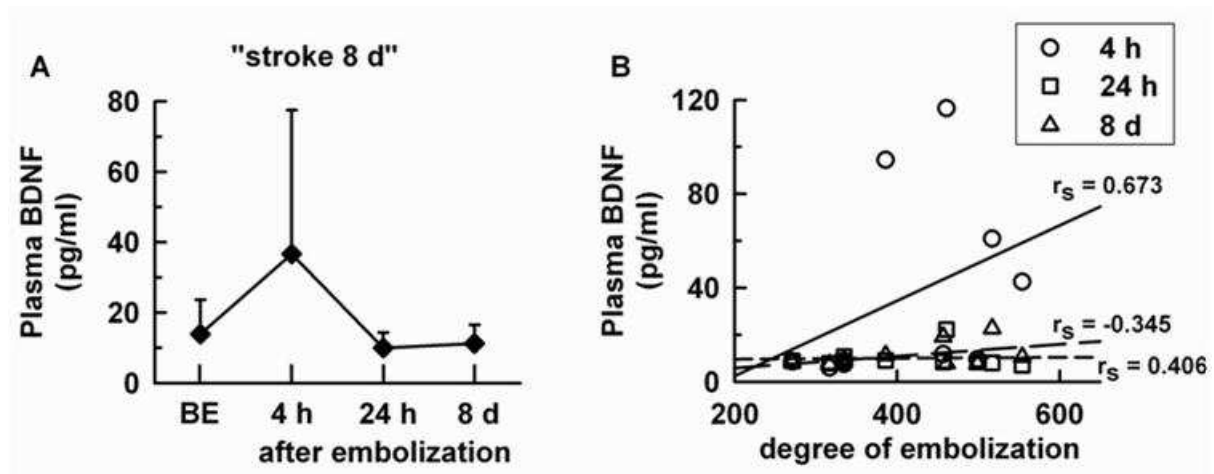


Figure 3. Brain BDNF levels after stroke. A) brain was collected in control rats (empty bars, 7 rats) and in the “stroke 4h”, “stroke 24h”, and “stroke 8d” groups (dashed bars, 10 rats per group), B). Scatter plot between levels of BDNF in individual brains and degree of cerebral embolization. Data are expressed as mean $\pm$ SD, * significantly different from control rats ($p < 0.016$), r_s = Spearman’s rank correlation coefficient.

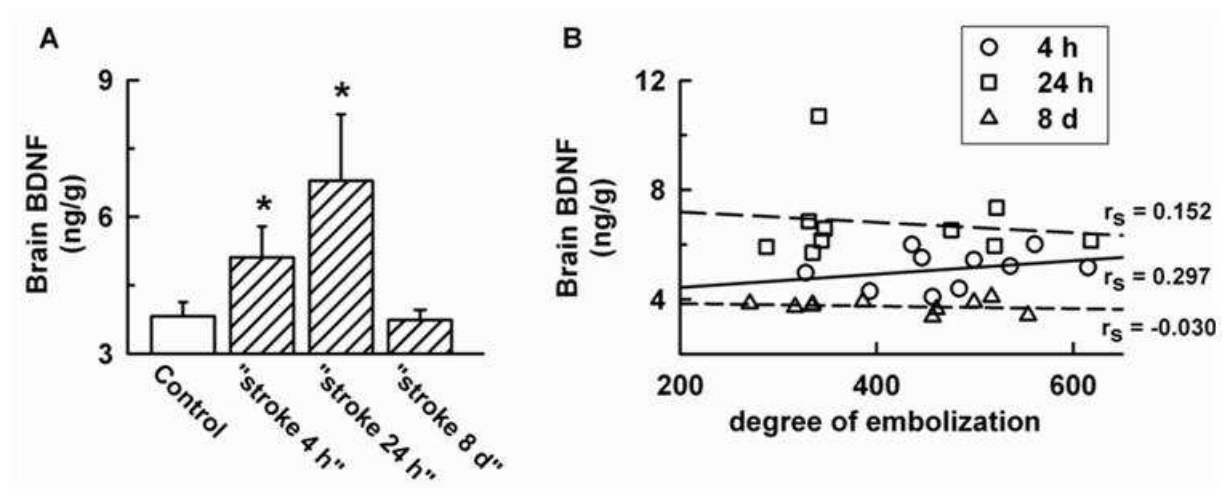
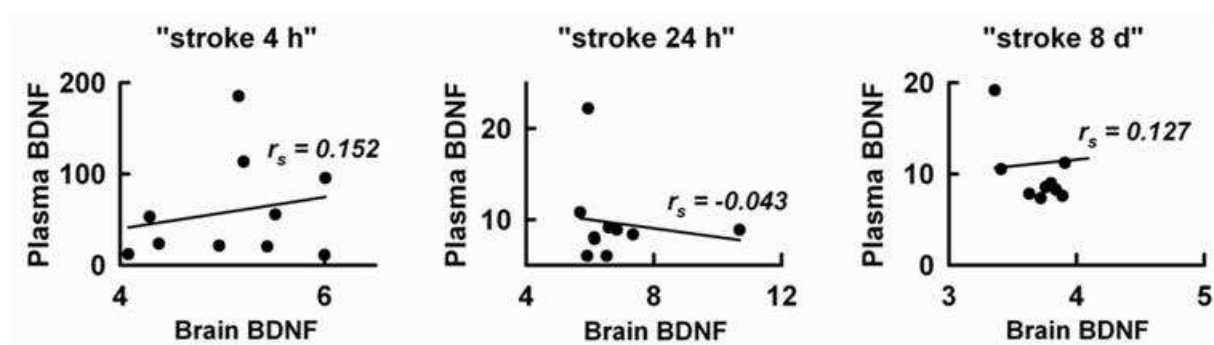


Figure 4. Scatter plot between individual levels of BDNF in plasma (ng/mL) and brains (ng/g) that were simultaneously measured 4h, 24h, and 8d after embolization in the “stroke 4h”, “stroke 24h”, and “stroke 8d” groups (10 rats per group), respectively, r_s = Spearman’s rank correlation coefficient.



III- Etude 3 : Effet de la fluoxétine sur la récupération motrice après un infarctus cérébral aigu : essai randomisé contrôlé contre placebo.

Publication originale : Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): a randomised placebo-controlled trial.

Chollet F, Tardy J, Albucher JF, Thalamas C, Berard E, Lamy C, Béjot Y, Deltour S, Jaillard A, Niclot P, Guillon B, Moulin T, Marque P, Pariente J, Arnaud C, Loubinoux I.
Lancet Neurol. 2011;10:123-30.

A- Objectifs de l'étude

Cet essai randomisé contrôlé contre placebo avait pour objectif principal d'évaluer l'efficacité de l'administration précoce de fluoxétine, un inhibiteur sélectif de la recapture de la sérotonine, sur la récupération motrice à 3 mois des patients victimes d'un infarctus cérébral.

Dans cette étude, la récupération motrice des patients était évaluée par une échelle clinique : la Fugl-Meyer Motor Scale (FMMS). Cette échelle avait été choisie car elle possède une excellente fiabilité et validité inter et intra-observateurs, et est capable de détecter des variations même minimales de la fonction motrice (Gladstone et al., 2002).

L'intérêt de ce travail était de démontrer de manière fiable d'un point de vue méthodologique que les stratégies médicamenteuses visant à stimuler la plasticité post-lésionnelle peuvent s'avérer efficaces chez l'Homme, et de confirmer ainsi que la modulation pharmacologique de la plasticité cérébrale est possible.

B- Principaux résultats

- Parmi les 118 patients inclus dans cette étude, la récupération motrice à 3 mois était significativement meilleure chez ceux bénéficiant d'un traitement par fluoxétine, comparée à celle observée sous placebo.
- Cette amélioration concernait aussi bien le membre supérieur que le membre inférieur parétique.
- Ce résultat positif était indépendant de l'effet bénéfique du traitement sur le risque de survenue d'une dépression.
- Le traitement par fluoxétine était bien toléré par les patients.



Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): a randomised placebo-controlled trial

François Chollet, Jean Tardy, Jean-François Albuher, Claire Thalamas, Emilie Berard, Catherine Lamy, Yannick Bejot, Sandrine Deltour, Assia Jaillard, Philippe Niclot, Benoit Guillon, Thierry Moulin, Philippe Marque, Jérémie Pariente, Catherine Arnaud, Isabelle Loubinoux

Summary

Background Hemiplegia and hemiparesis are the most common deficits caused by stroke. A few small clinical trials suggest that fluoxetine enhances motor recovery but its clinical efficacy is unknown. We therefore aimed to investigate whether fluoxetine would enhance motor recovery if given soon after an ischaemic stroke to patients who have motor deficits.

Methods In this double-blind, placebo-controlled trial, patients from nine stroke centres in France who had ischaemic stroke and hemiplegia or hemiparesis, had Fugl-Meyer motor scale (FMMS) scores of 55 or less, and were aged between 18 years and 85 years were eligible for inclusion. Patients were randomly assigned, using a computer random-number generator, in a 1:1 ratio to fluoxetine (20 mg once per day, orally) or placebo for 3 months starting 5–10 days after the onset of stroke. All patients had physiotherapy. The primary outcome measure was the change on the FMMS between day 0 and day 90 after the start of the study drug. Participants, carers, and physicians assessing the outcome were masked to group assignment. Analysis was of all patients for whom data were available (full analysis set). This trial is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT00657163.

Findings 118 patients were randomly assigned to fluoxetine (n=59) or placebo (n=59), and 113 were included in the analysis (57 in the fluoxetine group and 56 in the placebo group). Two patients died before day 90 and three withdrew from the study. FMMS improvement at day 90 was significantly greater in the fluoxetine group (adjusted mean 34.0 points [95% CI 29.7–38.4]) than in the placebo group (24.3 points [19.9–28.7]; $p=0.003$). The main adverse events in the fluoxetine and placebo groups were hyponatraemia (two [4%] vs two [4%]), transient digestive disorders including nausea, diarrhoea, and abdominal pain (14 [25%] vs six [11%]), hepatic enzyme disorders (five [9%] vs ten [18%]), psychiatric disorders (three [5%] vs four [7%]), insomnia (19 [33%] vs 20 [36%]), and partial seizure (one [1%] vs 0).

Interpretation In patients with ischaemic stroke and moderate to severe motor deficit, the early prescription of fluoxetine with physiotherapy enhanced motor recovery after 3 months. Modulation of spontaneous brain plasticity by drugs is a promising pathway for treatment of patients with ischaemic stroke and moderate to severe motor deficit.

Funding Public French National Programme for Clinical Research.

Introduction

Thrombolysis with alteplase given within the first few hours of an ischaemic stroke has long been the only treatment recognised to improve the spontaneous recovery of neurological functions. However, we have learnt over the past decade, by use of neuroimaging and electrophysiological techniques, that spontaneous recovery of neurological functions is associated with a large intracerebral reorganisation of the damaged human brain.

Various interventions, such as monoaminergic drugs, have been shown to modulate brain plasticity after a stroke and to reduce the residual neurological deficit and subsequent disability.^{1–3} Amphetamines have enhanced recovery in animal models of acute brain lesions, whereas neuroleptic drugs or benzodiazepines have reduced it.^{1–3} Little evidence exists for the efficacy of serotonin-reuptake inhibitors in studies of animals, but these inhibitors have an acute neuroprotective action on the ischaemic brain

and promote hippocampal neurogenesis.^{4–6} In clinical trials of amphetamine in patients with stroke, either no positive effect was noted on the recovery of motor function or the results were contradictory.^{7–11} The few small clinical trials of serotonin-reuptake inhibitors that have been reported (table 1) all suggest that drugs of this type might have a positive effect.^{13–16} Use of functional MRI in other studies showed that single doses of fluoxetine and paroxetine overactivated motor cortices compared with placebo in both healthy individuals and patients with stroke, and use of transcranial magnetic stimulation showed that cortex overactivation was associated with drug-induced cortex hyperexcitability.¹²

In the fluoxetine in motor recovery of patients with acute ischaemic stroke (FLAME) trial, we aimed to test whether a 3-month treatment with fluoxetine would enhance motor recovery when given early after an ischaemic stroke to patients with moderate to severe motor deficits.

Lancet Neurol 2011; 10: 123–30
Published Online
January 10, 2011
DOI:10.1016/S1474-4422(10)70314-8
See Comment page 110
See In Context page 119
Neurology Department (F Chollet MD, J Tardy MD, J-F Albuher MD, J Pariente MD) and **Clinical Epidemiology Unit** (E Berard MD, C Arnaud MD), **Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Hôpital Purpan, Toulouse, France**; **Institut des Sciences du Cerveau de Toulouse (INSERM, CNRS, Université de Toulouse), Toulouse, France** (F Chollet, J Tardy, J-F Albuher, J Pariente, P Marque MD, I Loubinoux PhD); **Université de Toulouse, Université Paul Sabatier INSERM, Imagerie Cérébrale et Handicaps Neurologiques UMR 825, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Hôpital Purpan, Purpan, Toulouse, France** (F Chollet, J Tardy, J-F Albuher, J Pariente, P Marque); **Unité Mixte de Recherche INSERM U558/Université Toulouse III, Toulouse, France** (E Berard, C Arnaud); **Clinical Investigation Centre INSERM CIC-9302 and Department of Clinical Pharmacology, Université de Toulouse, Toulouse, France** (C Thalamas MD); **Service de Neurologie, Hôpital Sainte-Anne, Paris, France** (C Lamy MD); **Service de Neurologie, Hôpital Général, Dijon, France** (Y Bejot MD); **Service des Urgences Cérébro-Vasculaires, Hôpital Pitié Salpêtrière, Paris, France** (S Deltour MD); **Centre d'Investigation Clinique, Hôpital Michalon, Grenoble, France** (A Jaillard MD); **Centre Hospitalier René Dubos, Pontoise, France** (P Niclot MD); **Service de Neurologie, Hôpital Nord Laennec, Nantes, France** (B Guillon MD); and **Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Besançon, France** (T Moulin MD)

	Drug(s)	Dose, regimen, and treatment duration	Number of patients	Trial design	Time of inclusion after stroke	Clinical outcome criteria	Other outcome criteria	Patients in rehabilitation programme	Main results
Dam et al ¹²	Fluoxetine and maprotiline	Fluoxetine 20 mg once per day for 90 days	48	Parallel groups (three groups)	1–6 months	Graded neurological scale (HSS)	None	Yes	10.7% improvement in HSS score
Pariante et al ¹³	Fluoxetine	20 mg (single dose)	8	Crossover	15–30 days	Finger tapping and dynamometer	Functional MRI; hyperactivation of motor cortices	Yes	20–30% finger tapping and dynamometer improvement
Zittel et al ¹⁴	Citalopram	40 mg (single dose)	8	Crossover	More than 6 months	Motor dexterity with nine-hole-peg test	None	Yes	11.4% improvement in nine-hole-peg test
Acler et al ¹⁵	Citalopram	10 mg once per day for 30 days	20	Parallel groups (two groups)	Not reported	NIHSS score	TMS: modulation of cortical excitability	Yes	38.8% improvement of NIHSS score

Results of all trials showed positive effects on motor performance. Results of a randomised placebo-controlled trial by Gerdelat-Mas and colleagues¹⁶ in healthy individuals also confirmed the modulation of cortical excitability induced by transcranial magnetic stimulation (TMS) with a single and chronic doses of paroxetine. HSS=hemispheric stroke scale. NIHSS=National Institutes of Health stroke scale.

Table 1: Reported prospective randomised placebo-controlled clinical trials of selective serotonin-reuptake inhibitors in motor recovery after ischaemic stroke

Hospitaier Universitaire de Besançon, Besançon, France
(T Moulin MD)
Correspondence to:
Prof François Chollet, Neurology
Department, Hôpital Purpan,
Place Baylac, 31059,
Toulouse, France
francois.chollet@inserm.fr

	Fluoxetine (n=59)	Placebo (n=59)
Age (years)	66.4 (11.7)	62.9 (13.4)
Men	37 (63%)	35 (59%)
Body-mass index (kg/m ²)	26.2 (4.4)	25.3 (4.2)
Vascular risk factors		
Diabetes	14 (24%)	11 (19%)
Hypertension	39 (66%)	40 (68%)
Dyslipidaemia	36 (61%)	33 (56%)
Current smoker	30 (51%)	26 (44%)
Previous cardiac disease	34 (58%)	28 (47%)
Atrial fibrillation	6 (10%)	7 (12%)
Previous stroke	10 (17%)	4 (7%)
Stroke characteristics		
Location		
Carotid territory	51 (86%)	49 (83%)
Vertebrobasilar territory	6 (10%)	4 (7%)
Lacunar	2 (3%)	6 (10%)
Baseline stroke severity		
Total FMMS score	17.1 (11.7)	13.4 (8.8)
Upper limb FMMS score	5.5 (5.5)	4.7 (4.2)
Lower limb FMMS score	11.6 (7.9)	8.7 (6)
NIHSS score	12.8 (3.9)	13.1 (4.3)
NIHSS motor component score	9.9 (2.2)	10.3 (1.9)
Modified Rankin scale score		
0–2	0	0
3: moderate disability	2 (3%)	0
4: moderately severe disability	25 (42%)	22 (37%)
5: severe disability	32 (54%)	37 (63%)
Intravenous thrombolysis	21 (36%)	17 (29%)
MADRS score	5.6 (5.9)	5.2 (5.5)
Time from stroke to treatment (days)	8.9 (1.8)	8.8 (1.8)

Data are number (%) or mean (SD). FMMS=Fugl-Meyer motor scale. NIHSS=National Institutes of Health stroke scale. MADRS=Montgomery Åsberg depression rating scale.

Table 2: Demographic and baseline characteristics

Methods

Participants

Patients who had an acute ischaemic stroke within the past 5–10 days that caused hemiparesis or hemiplegia were prospectively enrolled from nine stroke units in France. Those who were aged between 18 years and 85 years and who had Fugl-Meyer motor scale (FMMS) scores of 55 or less at baseline were eligible for inclusion.

Patients were excluded if they had severe post-stroke disability (National Institutes of Health stroke scale [NIHSS] score >20), substantial premorbid disability, or a pre-existing deficit that could interfere with assessments—ie, residual motor deficit from a previous stroke, comprehension deficits severe enough to prevent understanding of motor testing, or severe aphasia masking detection and assessment of depression. Patients were excluded if they were clinically diagnosed with depression or Montgomery Åsberg depression rating scale (MADRS) score of more than 19;¹⁷ taking antidepressant drugs, monoamine oxidase inhibitors, neuroleptic drugs, or benzodiazepines during the month before inclusion; or due to undergo carotid endarterectomy. Other exclusion criteria included pregnancy and other major diseases that would prevent follow-up. Enrolment, follow-up, and clinical assessments were done in each centre by the investigators.

The study was approved for all centres, according to the French law, by the Toulouse Ethics Committee. All patients provided written informed consent.

Randomisation and masking

Randomisation was balanced by centre, with an allocation sequence based on a block size of four, generated with a computer random-number generator by the pharmacist at the coordinating centre (Hôpital Purpan, Toulouse). The pharmacist assigned the participants to the trial groups in accordance with the randomisation list. Allocation was concealed by use of sequentially numbered

opaque envelopes. Fluoxetine and placebo capsules were both prepared by the pharmacist for the study. The capsules were distributed to each centre by the Toulouse Hospital Pharmacy. The placebo was identical to the active drug in appearance and packaging.

An independent organisation (Centre d'Investigation Clinique, Toulouse, France) was in charge of the logistic coordination of the study. Patients, carers, all site study staff, and investigators were masked to treatment assignment.

Procedures

Patients were randomly allocated to fluoxetine (20 mg once per day, orally) or placebo for 90 days. All patients, irrespective of the treatment group, also received physiotherapy during the treatment period. Physiotherapists were instructed not to design a specific rehabilitation programme but to use the normal protocol for their centre. All participants received standard care, delivered by an organised inpatient stroke care team.

The primary outcome was the mean change in FMMS score¹⁸ between inclusion (day 0) and day 90. FMMS is an index that is widely used for assessment of motor recovery after stroke and has excellent intra-rater and inter-rater reliability and validity.¹⁹ The motor domain ranges from a score of 0 (flaccid hemiplegia) to 100 (normal movement), with 66 points for the upper limb and 34 points for the lower limb; each item is rated as not, partly, or fully performed. All motor assessments were made by a physiotherapist at day 0 (baseline) and then 30 days and 90 days after enrolment. Secondary endpoints were NIHSS,^{20,21} modified Rankin scale (mRS),²² and MADRS,²³ with all scores measured at baseline, day 30, and day 90.

Data were gathered for adverse events and deaths within 3 months after randomisation. Reports were periodically examined by the FLAME executive committee, which tried to assess whether the side-effects could be related or not to the drug intake, but the committee remained masked during the study. When depression occurred (according to clinical assessment) during the 3 months of treatment, clinicians were instructed to continue the study treatment (fluoxetine or placebo), to avoid use of any other antidepressant drugs and, if necessary, to give open-label fluoxetine (20 mg once a day) so that the patient received either 20 mg (placebo group) or 40 mg per day (fluoxetine group). If a patient was given another antidepressant drug, the study treatment was stopped. The blinding code was not broken. All patients were followed up until day 90.

Statistical analysis

The trial was designed to have greater than 90% power to detect a 40% difference in the change in the FMMS score (ie, 12 points, which corresponds to a full

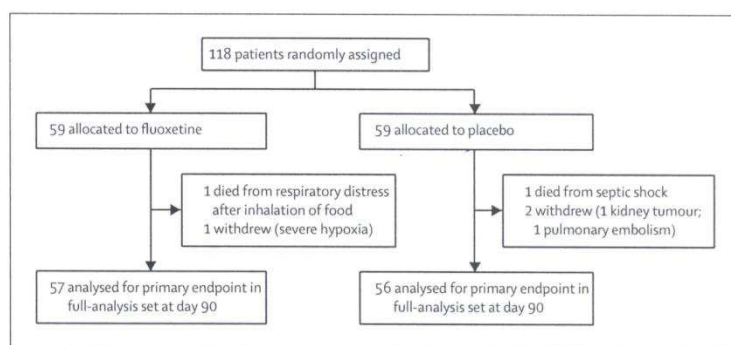


Figure 1: Trial profile

	Fluoxetine (n=57)	Placebo (n=56)	Difference between groups (95% CI)	p value
Day 90				
Total score				
Mean (SD)	53.7 (27.8)	35.1 (22)	18.6 (9.2 to 27.9)	..
Median (IQR)	59 (28 to 77)	29 (22 to 47.5)	..	0.0006*
Upper limb				
Mean (SD)	29.7 (22.2)	16.2 (16.6)	13.5 (6.2 to 20.8)	..
Median (IQR)	32 (6 to 50)	10 (4 to 24)	..	0.001*
Lower limb				
Mean (SD)	24 (7.9)	18.9 (8.2)	5.1 (2.1 to 8.1)	..
Median (IQR)	27 (19 to 31)	19 (13 to 25)	..	0.001*
Change from day 0 to day 90				
Total score				
Mean (SD)	36.4 (21.3)	21.9 (16.7)	14.5 (7.3 to 21.6)	..
Adjusted mean (95% CI)	34.0 (29.7 to 38.4)	24.3 (19.9 to 28.7)	9.8 (3.4 to 16.1)	0.003†
Upper limb				
Mean (SD)	24.2 (19.8)	11.8 (14.8)	12.4 (5.9 to 18.9)	..
Adjusted mean (95% CI)	22.9 (18.6 to 27.1)	13.1 (8.9 to 17.4)	9.7 (3.6 to 15.9)	0.002†
Lower limb				
Mean (SD)	12.2 (6.8)	10.1 (6.8)	2.1 (-0.4 to 4.6)	..
Adjusted mean (95% CI)	12.8 (11.1 to 14.5)	9.5 (7.8 to 11.2)	3.3 (0.8 to 5.7)	0.010†

Mean was adjusted for age, history of stroke, and FMMS score at inclusion. *Mann-Whitney U test. †Linear regression including treatment and centre as fixed effects, and confounding factors (age, history of stroke, and FMMS score at inclusion).

Table 3: Fugl-Meyer motor scale (FMMS) scores

recovery of six functions or incomplete recovery of 12 functions, and is judged to be clinically relevant) 3 months after the stroke if 100 patients were enrolled, assuming a spontaneous 30-point (SD 18) mean increase at day 90.²⁴ Because we expected frequency of patients lost to follow-up to be high, related to depression and complications after stroke, we planned to enrol up to 168 patients. However, the loss to follow-up was lower than expected, leading us to stop the enrolment after 118 patients.

Baseline characteristics, including disease description, were reported by use of descriptive statistics (eg, mean and SD for continuous variables, or frequency

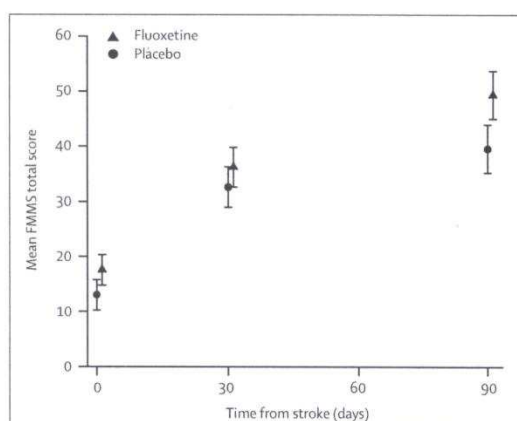


Figure 2: Adjusted mean Fugl-Meyer motor scale (FMMS) total scores at days 0, 30, and 90
Mean was adjusted for centre, age, history of stroke (at days 0, 30, and 90), and FMMS score at inclusion (at days 30 and 90). Error bars represent 95% CI.

	Fluoxetine	Placebo	p value
NIHSS scores on day 90	n=57	n=55	..
Total score, mean (SD)	5.8 (3.7)	6.9 (4.4)	0.151*
Patients with score 0–5, adjusted mean (95% CI)	55% (45 to 64)	43% (34 to 52)	0.193†
Motor scores, mean (SD)	4.7 (3.2)	6.3 (3.2)	0.012‡
mRS scores on day 90	n=57	n=55	..
Patients with mRS score 0–2§	15 (26%)	5 (9%)	0.015‡
Patients with mRS score 0–2§, adjusted mean (95% CI)	34% (25 to 43)	11% (6 to 15)	0.021¶
MADRS scores	n=56	n=54	..
Day 90, mean (SD)	5.4 (4.9)	8.4 (7.9)	..
Day 90, median (IQR)	4.5 (1.5 to 8)	7.5 (0 to 14)	0.101
Change from day 0 to day 90, mean (SD)	0 (6.1)	3.1 (9.1)	..
Change from day 0 to day 90, adjusted mean (95% CI)	-0.1 (-2.1 to 1.9)	3.2 (1.1 to 5.3)	0.032**

Data are number (%), unless otherwise indicated. Mean was adjusted for age, history of stroke, and Fugl-Meyer motor scale score at inclusion. NIHSS=National Institutes of Health stroke scale. mRS=modified Rankin scale. MADRS=Montgomery Åsberg depression rating scale. *Student's *t* test. †Binomial regression including treatment and centre as fixed effects, and confounding factors (age, history of stroke, and NIHSS score at inclusion). ‡ χ^2 test. §None of the patients had an mRS score of 0. ¶Binomial regression including treatment and centre as fixed effects, and confounding factors (age, history of stroke, and mRS score at inclusion). ||Mann-Whitney *U* test. **Linear regression including treatment and centre as fixed effects, and confounding factors (age, history of stroke, and Fugl-Meyer motor scale score at inclusion).

Table 4: Secondary endpoints

tabulations for categorical variables) for each group. Homogeneity of these variables was assessed descriptively.²⁵ At day 90, FMMS, NIHSS, and MADRS scores were compared in the treatment groups by use of a Student's *t* test or Mann-Whitney *U* test when appropriate. Patients were classified on the basis of mRS scores as independent (scores 0–2) or non-independent (scores 3–5), and the groups were compared at day 90 by use of the χ^2 test. The primary analysis for efficacy (full-analysis set) consisted of a comparison of the change in FMMS distribution (total score, upper

limb score, and lower limb score) over 90 days. We did a multiple linear regression analysis to control for centre and baseline factors that showed treatment group imbalance. The same approach was used to assess changes from day 0 to day 90 in MADRS scores (secondary endpoint). We also undertook post-hoc binomial regression analyses to test whether the treatment had an effect at day 90 on the mRS scores (probability of being an independent patient—ie, with a score of 0–2) and on NIHSS scores (probability of having a less severe outcome—ie, with scores of 0–5) compared with placebo. The analyses were adjusted for centre, age of patient, history of stroke, and mRS or NIHSS scores, accordingly, at baseline. All reported *p* values are two-sided. The statistical analyses were done by use of STATA (version 11.0).

This study is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT00657163.

Role of the funding source

The sponsor had no involvement in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The principal investigator (FC) had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit the report for publication.

Results

Between March 14, 2005, and June 9, 2009, 118 patients were prospectively enrolled. The two groups were well balanced in terms of baseline and demographic characteristics and stroke severity (table 2). However, mean age was slightly higher and previous history of stroke was more frequent in the fluoxetine group than in the control group. FMMS score at inclusion was higher in the fluoxetine group than in the placebo group (table 2). NIHSS, mRS, and MADRS mean scores did not differ in the two groups (table 2).

Treatment compliance was similar in the two groups. The mean cumulative dose at day 90 (defined as the sum of all doses taken during the treatment period) was 88.3 tablets (SD 11.6) in the fluoxetine group and 87.4 tablets (12.3) in the placebo group (*p*=0.722). The mean dose intensity at day 90 (calculated as the overall cumulative dose divided by the number of days that the patient was receiving a dose) was 0.9 tablets (0.1) per day in both groups (*p*=0.854). The mean relative dose intensity (dose intensity divided by the planned dose intensity) was 94.8% (12.6) in the fluoxetine group and 94.0% (13.0) in the placebo group (*p*=0.854).

Study treatment began a similar number of days after the stroke in the fluoxetine and placebo groups. 113 patients were included in the full-set analysis (figure 1). Two patients died before day 90, and three withdrew from follow-up (figure 1). Mean progression in FMMS total score from baseline to day 90 was significantly higher in the fluoxetine group than in the placebo group after controlling for centre, age, history of stroke, and FMMS

score at inclusion (table 3). The gain was significant for both the upper and the lower limb scores. The adjusted mean FMMS total score was significantly higher at day 90 in the fluoxetine group than in the placebo group (figure 2).

3 months after the stroke, NIHSS total score did not significantly differ in the fluoxetine and control groups, whereas the motor component score was significantly higher in the fluoxetine group (table 4). However, after controlling for age, history of stroke, and FMMS score at baseline, the probability of having a NIHSS score of 0–5 did not significantly differ between groups. Independence in activities of daily life, measured by use of mRS, improved during treatment in both groups, but at day 90 the proportion of independent patients (mRS scores 0, 1, or 2) adjusted for centre, age, history of stroke, and mRS score at baseline was significantly higher in the fluoxetine group than in the control group (table 4; figure 3).

The distribution of the MADRS scores did not differ significantly between the fluoxetine and control groups at inclusion or at day 90, whereas the adjusted mean change in MADRS scores between day 0 and day 90 was significantly lower in the fluoxetine group than in the placebo group (table 4). Moreover, the frequency of depression was significantly higher in the placebo group (17 [29%] patients) than in the fluoxetine group (four [7%] patients; $p=0.002$).

After adjustment of our analysis for clinical depression diagnosed before day 90, we noted that FMMS change between day 0 and day 90 was still significantly greater in the fluoxetine group (adjusted mean 34.2 points [95% CI 29.7 – 38.6]) than in the placebo group (24.2 [19.6–28.7]; $p=0.004$). In a sensitivity analysis of the subgroup of patients who were not given thrombolysis ($n=36$ in fluoxetine group, $n=40$ in placebo), improvement in FMMS was still significantly higher in the fluoxetine group (37.7 [32.0–43.3]) than in the placebo group (24.4 [19.1–29.7]; $p=0.002$).

Two patients died (one in each group; figure 1). The cause of death was related to their neurological disorder (septic shock, respiratory distress; figure 1). The main adverse events were hyponatraemia, transient digestive disorders including nausea, diarrhoea, and abdominal pain, hepatic enzyme disorders, psychiatric disorders, insomnia, and partial seizure (table 5). Two of the adverse events in the fluoxetine group were serious (one hyponatraemia and one partial seizure). Transient digestive disorders were more frequent in the fluoxetine group ($p=0.19$). Treatment was not interrupted in patients with adverse events.

Discussion

We noted a positive effect on motor recovery in patients with acute ischaemic stroke who were treated with fluoxetine for 3 months. This effect, assessed as a change in FMMS score between day 0 and day 90, was noticeable

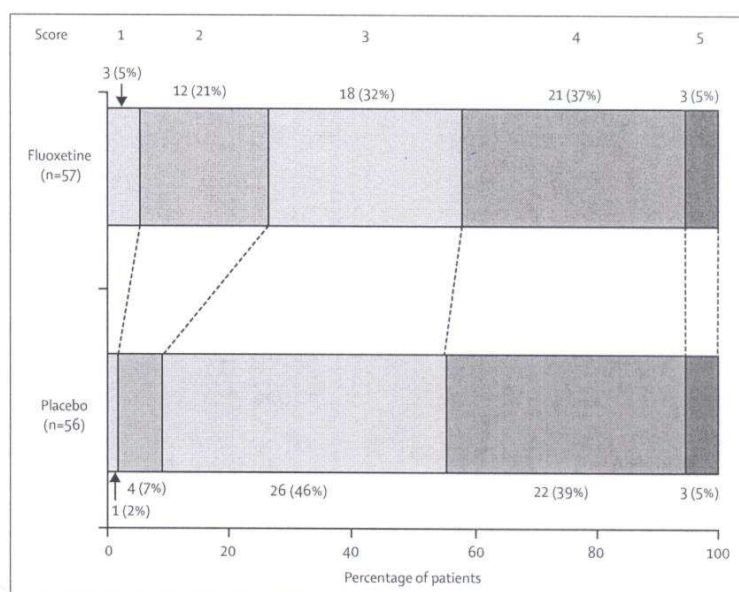


Figure 3: Distribution of modified Rankin scale scores at day 90

Data are number (%).

	Fluoxetine (n=57)	Placebo (n=56)
Hyponatraemia	2 (4%)	2 (4%)
Nausea	5 (9%)	0
Diarrhoea	7 (12%)	4* (7%)
Abdominal pain	2 (4%)	2 (4%)
Hepatic enzyme disorders	5† (9%)	10 (18%)
Psychiatric disorders	3‡ (5%)	4 (7%)
Insomnia	19 (33%)	20 (36%)
Partial seizure	1 (2%)	0

Data are number (%). *Five adverse events in four patients. †Six adverse events in five patients. ‡Four adverse events in three patients.

Table 5: Adverse events

in the FMMS subscores for both the upper and the lower limb at day 90. By contrast, no effect was noted with NIHSS at day 90. However, NIHSS motor component score at day 90 was lower in the fluoxetine group than in the placebo group, in agreement with the data for FMMS scores. The mRS scores showed more independent patients (scores 0–2) in the fluoxetine group than in the placebo group at day 90, which, when combined with the efficacy of fluoxetine, confirms the major role of motor function recovery in global recovery and return to independent activities of everyday life.

Results from some early and more recent studies suggested that a tight coupling between physiotherapy and drug therapy was necessary for beneficial motor changes.^{7–11} In our study, all patients were admitted to a dedicated stroke unit and were all included in the local daily inpatient management. Some were given acute

For more on Recommandations
de la Haute Autorité de Santé
2009: Accident Vasculaire
Cérébral: prise en charge
précoce 2009 see
[www.has-sante.fr/portail/
jcms/c_830203](http://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_830203)

thrombolysis with intravenous alteplase within the first 4–5 h after the stroke, in accordance with the recommendations of the French health authorities. The number of patients given thrombolysis was not significantly different in the fluoxetine and the placebo groups, and we did not note any confounding effect of thrombolysis in this study. Physiotherapy and rehabilitation was delivered to each patient during the 3-month treatment. Because intercentre variability in the rehabilitation interventions was high, we decided that each centre would propose rehabilitation interventions according to the current onsite procedures rather than according to a unified procedure. A possible centre effect was taken into account in the linear regression analysis.

Patients were enrolled, allocated to treatment, and first given treatment between days 5 and 10 after the stroke to exclude those who had early complications that would have compromised follow-up. Depressed patients and those with comprehension disturbances related to profound aphasia or cognitive impairment were also excluded. Patients had an initial severe motor deficit as assessed with the FMMS score (table 1), probably more severe than in patients in other trials: for example, in a trial of dexamfetamine that included 71 patients, mean FMMS score at inclusion was 26·9 in the dexamfetamine group and 30·0 in the placebo group.¹⁰

The treatment was well tolerated. Occurrence of depression during the 3 months was significantly lower in the fluoxetine group than in the placebo group, suggesting that fluoxetine when given early after the stroke can prevent depression. These results are in accord with those reported in other studies, showing the beneficial effect of serotonin-reuptake inhibitors on the occurrence of depression after stroke.^{26–28} An effect of fluoxetine on mood is likely, as shown by the significant difference in the change in MADRS score between the two groups. However, we do not think that fluoxetine acted only through antidepressant mechanisms in this study. In a previous study,¹³ a single dose of fluoxetine improved hand motor function and increased activity in the motor cortex compared with placebo in patients recovering from stroke, showing a specific motor effect, whereas a mood effect is unlikely after a single dose. However, a fluoxetine-mediated attention effect cannot be excluded in our patients.

Studies in animals show that the rate and extent of functional recovery after brain injury can be modulated by the effects of drugs on neurotransmitters in the CNS.^{1–3} For example, infusion of norepinephrine hastens recovery in rats with brain lesions, whereas antagonists delay the recovery process.¹ Further evidence for modulation of recovery has come from studies showing drug-induced physiological or structural changes in the brain that might be relevant to recovery. By contrast, little evidence exists to suggest that serotonin-reuptake inhibitors induce motor recovery after focal ischaemia in rats.⁴ However, fluoxetine was recognised to have a

neuroprotective effect in the post-ischaemic brain through its anti-inflammatory effects,⁵ and it has improved ischaemia-induced spatial cognitive deficits by increasing hippocampal neurogenesis after stroke in rats.⁶ One hypothesis is that a primary function of the brain serotonergic system is to facilitate motor output,²⁹ which emphasises that the drug intake would be more efficient when paired with training. In *Aplysia*, serotonin enhances short-term facilitation, storage of long-term memory in sensorimotor synapses, long-term facilitation, and growth factor gene expression.³⁰ As a monoamine, serotonin might promote long-term potentiation, optimise activity-dependent learning, and possibly facilitate relearning after stroke in human beings.³

Few clinical trials with serotonin-reuptake inhibitors have been reported (table 1; panel). They have all included small numbers of patients; all have results that suggest a positive effect on recovery after stroke. In an early trial, fluoxetine and maprotiline were tested against placebo for 3 months in patients with hemiplegic stroke enrolled 1–6 months after the stroke.¹² The patients in the fluoxetine group (n=16) had a better outcome than did those in the maprotiline or placebo groups.¹² Acler and colleagues¹⁵ confirmed this finding in ten patients in the active-treatment group versus ten in the placebo group. In a double-blind placebo-controlled study, Pariente and colleagues,¹³ by combining clinical motor testing and functional MRI motor

Panel: Research in context

Systematic review

We searched the Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL) on the Cochrane Library (issue 1, 2010), Medline (1985–2010), and Embase (1985–2010). We included placebo-controlled, randomised clinical trials in which the effects of selective serotonin-reuptake inhibitors on motor recovery after stroke were assessed. We also selected key articles and illustrative reviews of studies in animals, selective serotonin-reuptake inhibitors, and depression after stroke, and found a large number of references for clinical trials of amphetamines and dopamine in motor recovery after stroke.

Interpretation

The few previous clinical trials of selective serotonin-reuptake inhibitors after stroke^{12–15} were small and their results have suggested a positive effect on motor recovery. The results of the FLAME trial extend these findings by showing in a larger group of patients with moderate to severe hemiplegia after ischaemic stroke that early treatment with fluoxetine enhances motor recovery and reduces the number of dependent patients. The positive effect of the drug on motor function of recovering patients suggests that the neuronal, non-vascular-targeted action of selective serotonin-reuptake inhibitors provides a new pathway that should be explored further in the treatment of acute ischaemic stroke.

assessment in patients recovering from post-stroke hemiplegia (n=8), showed that a single dose (20 mg) of fluoxetine improved hand motor function and was correlated with an overactivation of motor cortices on functional MRI.¹³ In a subsequent double-blind, placebo-controlled trial in healthy individuals, transcranial magnetic stimulation has shown that the intake of a single dose of the serotonin-reuptake inhibitor paroxetine was associated with a hyperexcitability of the primary motor cortex, whereas chronic intake was associated with hypoexcitability of brain motor cortices.¹⁵ Serotonin-reuptake inhibitors increase interneuron-facilitating activity in the primary motor cortex. In a double-blind, placebo-controlled crossover trial, Zittel and colleagues¹⁶ investigated the effects of a single dose (40 mg) of citalopram in eight patients with chronic stroke; dexterity was significantly improved.¹⁴ Our trial is the largest in which the effects of serotonin-reuptake inhibitors and stroke recovery were investigated, and the largest in the specialty of monoamines and stroke recovery. Several trials with amphetamine or amphetamine-like drugs have been reported.^{1,7–11,31} The results of a few studies suggested amphetamine and norepinephrine were efficacious, but this positive effect was not confirmed in further larger trials.^{1,11,31} Notably, most of the trials included only a few patients (from eight to 71) and the dose (amphetamine 10 mg once per day) and regimen (1–17 days) remain questionable because no rationale was proposed for dose and duration of treatment. Results of other small trials of drugs including levodopa were contradictory and no definite conclusions could be drawn from them.^{7,32}

Although the results of the FLAME trial show the efficacy of fluoxetine in motor recovery of patients with ischaemic stroke, we must draw attention to some limitations of the study. First, the number of patients included was small. Those who were included were selected for motor deficit and did not represent the general population of stroke patients, as shown by the inclusion and exclusion criteria and the clinical characteristics at inclusion (table 2). Second, treatment was stopped after 90 days and we have no idea of the long-term development of patients' motor function and whether the treatment effect persisted in the months after treatment was stopped. Third, a potential random error cannot be eliminated completely and our results remain to be confirmed, even though error is unlikely because of the low p value associated with the change in the FMMS score at day 90 ($p=0.003$). However, the effect of fluoxetine seems to be strong and clinically relevant, and the data show a global coherence (ie, motor improvement in FMMS and motor items of NIHSS). Future studies should include a larger number of patients whose characteristics are more similar to those of the general population of patients with stroke; the primary outcome criteria should be more functional

(mRS, which scores the capacity of patients to return to home daily life, rather than FMMS, which is a pure neurological analytical scale of motor function), and the duration of treatment and permanence of the effects will have to be addressed. Selective serotonin-reuptake inhibitors are not a uniform category of drugs, and further basic science and pharmacology studies will also be needed to increase understanding of their mechanisms of action.

Fluoxetine is a well tolerated drug that no longer has a patent, and therefore its cost is reasonable. Acute deocclusion of brain arteries is already a successfully validated approach to treatment, and modulation of spontaneous brain plasticity by external agents is undoubtedly another promising pathway for patients with stroke.

Contributors

FC was the principal investigator, participated in the study design and data analysis, and wrote the report. JFA and JT participated in data collection, data analysis, and correction of the report. CA and EB participated in the statistical analysis and data analysis. CT contributed to the study design and data analysis, and liaised with the funding source. CL, YB, SD, AJ, BG, TM, and PN participated in data collection, reading the report, and giving scientific advice, and contributed to discussions. PM and JP contributed to the design of the study and correction of the report. IL gave scientific advice, and participated in reading and correction of the report.

Participating centres (number of patients)

Toulouse Purpan (57) F Chollet, J Tardy, J F Albuher, I Loubinoux, J Pariente, P Marque, A Damène, M Durrieux; Toulouse Rangueil (16) V Larrue; Dijon (15) M Giroud, Y Bejot; Paris Ste Anne (9) J L Mas, C Lamy, D Calvet, V Domigo; Paris Pitié Salpêtrière (8) Y Samson, S Deltour, A Leger; Grenoble (7) M Hommel, A Jaillard, O Detante; Pontoise (3) P Niclot, S Descombes, J Servant; Nantes (2) B Guillon, J Rome; Besançon (1) T Moulin, P Decavel.

Conflicts of interest

We declare that we have no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Clinical Research Hospital Program from the French Ministry of Health (PHRC 2003, to FC). We thank the Centre d'Investigation Clinique de Toulouse (O Rascol, F Puisset [pharmacist], S Bernard) for the global coordination of the trial and C Cristini for valuable expertise in statistics. This work was sponsored by the University Hospital of Toulouse for regulatory and ethics submission.

References

- Schallert T, Jones TA, Weaver MS, Shapiro LE, Crippens D, Fulton R. Pharmacologic and anatomic considerations in recovery of function. *Phys Med Rehabil* 1992; 6: 375–93.
- Liepert J. Pharmacotherapy in restorative neurology. *Curr Opin Neurol* 2008; 21: 639–43.
- Loubinoux I, Chollet F. Neuropharmacology in stroke recovery. In: Cramer SC, Nudo RJ, eds. *Brain repair after stroke*. Cambridge: Cambridge University Press, 2010: 183–93.
- Windle V, Corbett D. Fluoxetine and recovery of motor function after focal ischemia in rats. *Brain Res* 2005; 1044: 25–32.
- Lim CM, Kim SW, Park JY, Kim C, Yoon SH, Lee JK. Fluoxetine affords robust neuroprotection in the postischemic brain via its anti-inflammatory effect. *Neurosci Res* 2009; 87: 1037–45.
- Li WL, Cai HH, Wang B, et al. Chronic fluoxetine treatment improves ischemia-induced spatial cognitive deficits through increasing hippocampal neurogenesis after stroke. *J Neurosci Res* 2009; 87: 112–22.
- Sonde L, Lökk J. Effects of amphetamine and/or L-dopa and physiotherapy after stroke: a blinded randomized study. *Acta Neurol Scand* 2007; 115: 55–59.

- 8 Treig T, Werner C, Sachse M, Hesse S. No benefit from D-amphetamine when added to physiotherapy after stroke: a randomized, placebo-controlled study. *Clin Rehabil* 2003; 17: 590–99.
- 9 Platz T, Kim IH, Engel U, et al. Amphetamine fails to facilitate motor performance and to enhance motor recovery among stroke patients with mild arm paresis: interim analysis and termination of a double blind, randomised, placebo-controlled trial. *Restor Neurol Neurosci* 2005; 23: 271–80.
- 10 Gladstone DJ, Danells CJ, Armesto A, et al. Subacute Therapy with Amphetamine and Rehabilitation for Stroke Study Investigators. Physiotherapy coupled with dextroamphetamine for rehabilitation after hemiparetic stroke: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Stroke* 2006; 37: 179–85.
- 11 Walker Batson D, Smith P, Curtis S, et al. Amphetamine paired with physical therapy accelerates motor recovery after stroke. Further evidence. *Stroke* 1995; 26: 2254–59.
- 12 Dam M, Tonin P, De Boni A, et al. Effects of fluoxetine and maprotiline on functional recovery in poststroke hemiplegic patients undergoing rehabilitation therapy. *Stroke* 1996; 27: 1211–14.
- 13 Pariente J, Loubinoux I, Carel C, et al. Fluoxetine modulates motor performance and cerebral activation of patients recovering from stroke. *Ann Neurol* 2001; 50: 718–29.
- 14 Zittel S, Weiller C, Liepert J. Citalopram improves dexterity in chronic stroke patients. *Neurorehabil Neural Repair* 2008; 22: 311–14.
- 15 Acler M, Robol E, Fiaschi A, Manganotti P. A double blind placebo RCT to investigate the effects of serotonergic modulation on brain excitability and motor recovery in stroke patients. *J Neurol* 2009; 256: 1152–58.
- 16 Gerdelat-Mas A, Loubinoux I, Tombari D, Rascol O, Chollet F, Simonetta-Moreau M. Chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) paroxetine modulates human motor cortex excitability in healthy subjects. *Neuroimage* 2005; 27: 314–22.
- 17 Wiart L, Petit H, Joseph PA, Mazaux JM, Barat M. Fluoxetine in early post-stroke depression: a double-blind placebo-controlled study. *Stroke* 2000; 31: 1829–32.
- 18 Fugl-Meyer AR, Jaasko L, Leyman I, Olsson S, Stegling S. The post stroke hemiplegic patient. *Scand J Rehabil Med* 1975; 7: 13–31.
- 19 Gladstone DJ, Danells CJ, Black SE. The Fugl Meyer assessment of motor recovery after stroke: a critical review of its measurement properties. *Neurorehabil Neural Repair* 2002; 16: 232–40.
- 20 Brott T, Adams HP Jr, Olinger CP, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 1989; 20: 864–70.
- 21 Goldstein LB, Bertels C, Davis JN. Interrater reliability of the NIH stroke scale. *Arch Neurol* 1989; 46: 660–62.
- 22 Rankin J. Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60. II. Prognosis. *Scott Med J* 1957; 2: 200–15.
- 23 Montgomery SA, Asberg M. MADRS Scale. *Brit J Psychiatry* 1979; 134: 382–89.
- 24 Duncan PW, Goldstein LB, Horner RD, Landsman PB, Samsa GP, Matchar DB. Similar motor recovery of upper and lower extremities after stroke. *Stroke* 1994; 25: 1181–88.
- 25 Altman DG, Dore CJ. Randomisation and baseline comparisons in clinical trials. *Lancet* 1990 335: 149–53.
- 26 Fruehwald S, Gatterbauer E, Rehak P, Baumhackl U. Early fluoxetine treatment of post-stroke depression—a three-month double-blind placebo-controlled study with an open-label long-term follow up. *J Neurol* 2003; 250: 347–51.
- 27 Robinson RG, Jorge RE, Moser DJ, et al. Escitalopram and problem-solving therapy for prevention of poststroke depression: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008; 299: 2391–400.
- 28 Anderson CS, Hackett ML, House AO. Interventions for preventing depression after stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 2: CD003689.
- 29 Jacobs BL, Fornal CA. Serotonin and motor activity. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 820–25.
- 30 Barbas D, DesGroseillers L, Castellucci VF, Carew TJ, Marinesco S. Multiple serotonergic mechanisms contributing to sensitization in aplysia: evidence of diverse serotonin receptor subtypes. *Learn Mem* 2003; 10: 373–86.
- 31 Tardy J, Pariente J, Leger A, et al. Methylphenidate modulates cerebral post stroke reorganization. *Neuroimage* 2006; 33: 913–22.
- 32 Scheidtman K, Fries W, Muller F, Koenig E. Effect of levodopa in combination with physiotherapy on functional motor recovery after stroke: a prospective, randomised, double-blind study. *Lancet* 2001; 358: 787–90.

Conclusion

Nos travaux précliniques sont les premiers à montrer qu'en cas d'ischémie cérébrale :

- les cellules endothéliales cérébrales deviennent une source de BDNF
- la production non neuronale de BDNF par le cerveau est d'autant plus importante que la perte neuronale est sévère
- les taux circulants de BDNF ne sont pas le reflet des taux cérébraux

Le BDNF a été dosé dans le sang et dans le cerveau avant et après embolisation du cerveau avec un nombre variable de microsphères calibrées en carbone afin de reproduire le large panel de souffrance cérébrale (en termes de mort neuronale) rencontrée en clinique. Ce modèle est utilisé depuis longtemps au laboratoire (Bralet et al., 1979 ; Bralet et al., 1983 ; Gueldry et al., 1990 ; Demougeot et al., 2001 ; Millerot et al., 2005). Il conduit à la formation de multiples plages d'ischémie (autant que d'artérioles occluses) à l'origine de la formation d'infarctus affectant préférentiellement l'hippocampe, les corps striés, le thalamus et le cortex pariéto-temporal. Ce modèle est en conséquence éloigné de la clinique sur 2 points essentiels : l'ischémie est multifocale alors qu'elle est focalisée à un territoire chez le patient, l'ischémie est irréversible alors qu'une reperfusion spontanée ou induite (par le t-PA) est possible chez le patient. En fait, nous avons choisi ce modèle car il offre la possibilité de mesurer simultanément chez le même animal la sévérité des dommages neuronaux et le taux de BDNF. Par ailleurs, l'expérimentateur peut sélectionner les animaux en fonction de la sévérité de la mort neuronale qui est quantifiée (à posteriori) par le nombre de microsphères retrouvées dans le cerveau. Pour les modèles d'infarctus classiquement utilisés chez l'animal que sont l'occlusion (transitoire ou permanente) de l'artère cérébrale moyenne (OACM) et l'occlusion (irréversible) d'origine photothrombotique des petits vaisseaux du cortex cérébral, différentes intensités de mort neuronale peuvent être obtenues mais au prix d'une augmentation importante du nombre d'animaux (différents lots d'animaux avec des conditions expérimentales différentes concernant par exemple la durée de l'occlusion pour l'OACM transitoire ou la puissance de l'irradiation laser). Par ailleurs, pour ces 2 modèles, la sévérité de la mort neuronale est évaluée par la mesure du volume de l'infarctus, ce qui oblige à la fabrication de coupes cérébrales. Ainsi, certains animaux sont dédiés à la détermination de la sévérité de l'ischémie et d'autres aux mesures biochimiques. Pour le modèle embolisation, nous avons antérieurement montré qu'au niveau de l'hémisphère embolisé, la perte neuronale (quantifiée par la chute du taux de N-acétyl-aspartate, un marqueur neuronal)

était proportionnelle au degré d'embolisation (Demougeot et al, 2001). Aussi, le comptage des microsphères dans le culot d'homogénéisation et la mesure du taux de BDNF dans le surnageant permet de connaître, chez le même rat, la sévérité de la mort neuronale et le taux de BDNF. De façon importante, le BDNF cérébral a été dosé dans chacun des hémisphères et pas dans une région unique comme classiquement fait (cf état de l'art, III). En conséquence, toute augmentation du taux de BDNF signe obligatoirement une augmentation de la synthèse de BDNF (inutile de mesurer l'expression des ARNm du BDNF) mais évidemment ne permet pas d'identifier les régions impliquées.

Notre première étude montre que l'embolisation augmente le contenu hémisphérique en BDNF et que la surproduction de la neurotrophine est plus intense et plus prolongée pour l'hémisphère lésé que l'hémisphère non lésé. Ces données suggèrent que les mécanismes impliqués dans l'induction du gène *bdnf* diffèrent entre les 2 hémisphères. En accord avec cette hypothèse, nous avons montré que la surproduction de BDNF impliquait les neurones, les cellules épendymaires, les cellules endothéliales, microgliales et astrocytaires pour l'hémisphère lésé et que seuls les 2 premiers types cellulaires étaient impliqués pour l'hémisphère non lésé. Cette différence est compatible avec l'idée selon laquelle il est possible de moduler sélectivement la production de BDNF dans l'un ou l'autre des 2 hémisphères avec des drogues ciblant tel ou tel type cellulaire. De telles stratégies permettraient de faire avancer les connaissances sur la contribution à la récupération fonctionnelle post-AVC de la surproduction de BDNF dans l'hémisphère controlatéral à la lésion et sur le caractère éventuellement néfaste du déséquilibre dans la production de BDNF existant entre les 2 hémisphères. En effet, ce déséquilibre pourrait être impliqué dans la genèse des convulsions post-ischémiques (Binder et al., 2001). Cependant, le pré-requis à l'élaboration de telles stratégies est l'identification des mécanismes qui contrôlent *in vivo* la production de BDNF par les cellules non neuronales, point relativement délaissé par les chercheurs. Un résultat très intéressant de notre première étude est que la production hémisphérique de BDNF est toujours la même quelle que soit la sévérité de la mort neuronale. Ainsi, plus la mort neuronale est sévère plus les cellules non neuronales se mettent à produire du BDNF. Dit autrement, l'exposition des neurones survivants au BDNF est d'autant plus importante que ces neurones sont moins nombreux, suggérant que le cerveau a mis au point

une stratégie de défense capable de s'adapter à la sévérité de la mort neuronale. L'inflammation aiguë qui accompagne l'ischémie pourrait être au centre de cette stratégie. En effet, l'inflammation aiguë est définie comme une réponse de défense de l'organisme déclenchée par la mort cellulaire et dont l'objectif est de « réparer » le tissu lésé, de lui faire retrouver sa fonction. En cas d'ischémie cérébrale, l'inflammation aiguë est proportionnelle à la mort neuronale. Elle est dominée par l'activation des cellules microgliales et astrocytaires (Wang et al., 2007), cellules qui sont une source de BDNF (nos travaux ; Miklic et al., 2004 ; Saha et al., 2006 ; Jean et al., 2008 ; Lay et Todd, 2008 ; Madinier et al., 2009 ; Sato et al., 2009 ; Uchida et al., 2010). Nous avons même montré que le contenu hémisphérique en BDNF (coté lésé) était proportionnel à l'activation astrocytaire, elle-même proportionnelle à la mort neuronale. Une autre donnée apportée par notre étude est l'existence d'une expression forte du BDNF par les cellules endothéliales des vaisseaux situés dans les régions ischémisées. Certaines questions sont néanmoins sans réponse : Le BDNF est-il sécrété dans le sang ou dans l'espace interstitiel cérébral ? Et si le BDNF reste dans le cerveau, quelle est sa contribution à la récupération fonctionnelle spontanée ? En d'autres termes, la cellule endothéliale est-elle une cible potentielle de stratégies destinées à augmenter le taux cérébral de BDNF ? Si c'était le cas, alors des médicaments ne passant pas la BHE deviennent envisageables dans le traitement de l'AVC.

Notre seconde étude remet en cause l'idée selon laquelle, en cas d'ischémie, la production de BDNF par le cerveau peut être estimée par la mesure des taux circulants de la neurotrophine. L'absence d'association entre les 2 paramètres nous amène à aborder la question de la perméabilité de la BHE au BDNF. Le BDNF, qui est un peptide, est incapable de traverser la BHE selon un mécanisme de diffusion simple que ce soit dans le sens cerveau-sang ou sang-cerveau. Un transport spécifique du BDNF a été mis en évidence au niveau des cellules endothéliales cérébrales chez la souris (Pan et al., 1998) mais ces données n'ont pas été confirmées chez le rat (Podulso et Curran, 1996). L'ischémie cérébrale est associée à une rupture de la BHE au niveau de la région en souffrance suggérant que le BDNF produit par le cerveau peut en théorie passer dans le sang. Dans le modèle embolisation, la rupture de BHE est maximale à 24h (Bralet et al., 1979), et pourtant à ce temps les taux circulants de BDNF ne sont pas différents des valeurs pré-ischémiques. Ce résultat a 2 interprétations : le BDNF ne passe pas à travers la BHE endommagée, ou le passage a effectivement lieu mais sa mise

en évidence n'est pas possible compte tenu d'un effet de dilution dans le sang. Pour tester cette dernière possibilité, nous avons calculé de combien augmenterait la concentration en BDNF circulant si le BDNF produit en excès en cas d'ischémie passait en totalité dans le sang. Sachant que le volume plasmatique correspond à 8% du poids corporel (soit 12 ml), et que la surproduction cérébrale de BDNF observée pendant les 4 premières heures atteint 1600 pg, le BDNF plasmatique aurait dû approximativement augmenter de 25 à 160 pg/mL dans le plasma à la condition que le BDNF ne soit pas capté par les plaquettes, ce qui est peu probable. A côté, si le BDNF plasmatique d'origine cérébrale passe dans les plaquettes et que le BDNF plaquettaire est en totalité sécrété lors de la coagulation, le BDNF sérique aurait dû passer de 250 à 380 pg/mL, une telle augmentation devient plus difficile à mettre en évidence compte tenu de la variabilité interindividuelle des taux sériques de BDNF. Aussi, en cas d'AVC d'origine ischémique, le passage du BDNF à travers la BHE dans le sens cerveau-sang ne peut pas être exclu. Notre deuxième étude révèle également l'existence d'une corrélation entre le taux plasmatique de BDNF en phase aiguë de l'ischémie (4h après embolisation) et le degré d'embolisation suggérant que le BDNF plasmatique est un marqueur potentiel de la sévérité de l'ischémie au même titre que l'hypertension réactionnelle, l'hyperglycémie, les taux circulants des marqueurs de l'inflammation systémique (cf état de l'art, I-D). Cependant, compte tenu des nombreux facteurs capables d'influencer les taux circulants de BDNF, il est peu probable que le BDNF circulant soit utilisé un jour comme un outil biochimique pour quantifier la sévérité de la lésion chez les patients victimes d'un AVC. Par ailleurs, le dosage ELISA du BDNF se faisant sur 2 jours, se servir des taux circulants de BDNF comme un outil décisionnel concernant la fibrinolyse est inconcevable.

Notre étude clinique montre qu'un traitement journalier (20 mg) par la fluoxétine (PROZAC) débuté de façon précoce, 5 à 10j après les premiers symptômes de l'AVC ischémique, et associé à un programme standard de rééducation, améliore la récupération motrice à 3 mois. Le traitement a réduit l'incidence d'une dépression cliniquement significative à 3 mois mais l'effet bénéfique de la fluoxétine sur le déficit moteur est indépendant de son effet antidépresseur. Ces résultats sont encourageants et devront être confirmés sur une cohorte plus grande de patients et ce quelque soit le déficit moteur et cognitif à l'hospitalisation. Cependant, ils permettent de fonder de gros espoirs sur les

inhibiteurs de la recapture de la sérotonine pour la prise en charge pharmacologique du handicap associé à l'AVC. Les études réalisées chez l'animal et chez l'homme suggèrent que le bénéfice de la fluoxétine pourrait être relié à un effet neuroprotecteur (Lim et al., 2009) et/ou à un effet inducteur de la plasticité (Pariante et al., 2001), effets qui pourraient d'ailleurs être le résultat d'une induction de la synthèse de BDNF (Coppell et al., 2003 ; Maya Vetencourt et al., 2008 ; Lee et al., 2011). Cependant, il est possible que l'amélioration du déficit moteur post-AVC offert par la fluoxétine ne soit que le reflet du rôle de la sérotonine dans le contrôle des voies motrices. En effet, les faisceaux réticulospinaux incluent des neurones sérotoninergiques connus pour modifier l'excitabilité des interneurons et motoneurons médullaires. Un résultat intéressant de notre étude est que la fluoxétine est efficace aussi bien chez les patients fibrinolytés que non fibrinolytés suggérant que la molécule n'a pas besoin d'atteindre les régions ischémiées pour être efficace (en l'absence de fibrinolyse, le vaisseau reste le plus souvent occlus et l'apport de la molécule à la région ischémiée est très faible voire nulle). En d'autres termes, le bénéfice de la fluoxétine pourrait être dû à son action sur des régions cérébrales éloignées de la lésion, ceci est d'autant plus probable que pratiquement toutes les régions cérébrales reçoivent des afférences sérotoninergiques. Enfin, un point qui mérite à explorer concerne la durée optimale du traitement par la fluoxétine et notamment la persistance dans le temps des bénéfices pour le patient après arrêt de son administration.

Nos travaux concernant le BDNF ne permettent pas de discuter sur le rôle du BDNF dans la plasticité post-lésionnelle. En effet, la mesure des taux cérébraux de BDNF a fait appel à des kits ELISA utilisant des anticorps anti-BDNF reconnaissant une séquence peptidique du BDNF mature. Aussi, ils se fixent aussi bien sur le pré-pro BDNF, le pro-BDNF que le BDNFm. En conséquence, les taux de BDNF rapportés dans notre étude correspondent aux 3 formes de BDNF. Ceci pose problème si l'on considère que seul le BDNF mature exerce des effets bénéfiques en cas d'ischémie cérébrale. La mise en vente récente d'anticorps spécifiques du pro-BDNF autorise maintenant le dosage séparé du BDNFm et de son précurseur le pro-BDNF par la technique de Western Blotting et la possibilité d'étudier spécifiquement la localisation cellulaire du pro-BDNF par technique immunohistochimique. Le dosage séparé de chacune des formes de BDNF est d'ores et déjà au point au laboratoire qui envisage d'étudier l'effet de l'embolisation sur les taux hémisphériques de pro-BDNF et

BDNFm en fonction du temps et du degré de l'embolisation. Il est également envisagé de déterminer la nature exacte (précurseur ou forme mature) du BDNF présent dans les plaquettes et dans le plasma, ce qui devrait nécessiter une concentration par évaporation des échantillons.

Actuellement, le laboratoire teste l'hypothèse selon laquelle les bénéfices du traitement par le t-PA chez les patients victimes d'un AVC mettent en jeu, au delà de la recanalisation du vaisseau occlus, la transformation du pro-BDNF en BDNFm. Des études sont en cours chez l'animal et chez l'homme (déjà 28 patients inclus).

Bibliographie

Abboud H, Labreuche J, Plouin F, Amarenco P; GENIC Investigators. High blood pressure in early acute stroke: a sign of a poor outcome? *J Hypertens*. 2006;24:381-6.

Aboa-Eboulé C, Béjot Y, Osseby GV, Rouaud O, Binquet C, Marie C, Cottin Y, Giroud M, Bonithon-Kopp C. Influence of prior transient ischaemic attack on stroke prognosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82:993-1000.

Acler M, Robol E, Fiaschi A, Manganotti P. A double blind placebo RCT to investigate the effects of serotonergic modulation on brain excitability and motor recovery in stroke patients. *J Neurol*. 2009;256:1152-8.

Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24:35-41.

Adkins DL, Jones TA. D-amphetamine enhances skilled reaching after ischemic cortical lesions in rats. *Neurosci Lett*. 2005;380:214-8.

Ahmed R, Zuberi BF, Afsar S. Stroke scale score and early prediction of outcome after stroke. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2004;14:267-9.

Akaneya Y, Tsumoto T, Kinoshita S, Hatanaka H. Brain-derived neurotrophic factor enhances long-term potentiation in rat visual cortex. *J Neurosci*. 1997;17:6707-16.

Albers GW, Caplan LR, Easton JD, Fayad PB, Mohr JP, Saver JL, Sherman DG; TIA Working Group. Transient ischemic attack--proposal for a new definition. *N Engl J Med*. 2002;347:1713-6.

American Heart Association. Heart disease and stroke statistics, 2009 update. Dallas (TX): American Heart Association; 2009.

Anand N, Stead LG. Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *Cerebrovasc Dis*. 2005;20:213-9

Ando T, Takagi N, Takagi K, Kago T, Takeo S. Effects of nefiracetam on the levels of brain-derived neurotrophic factor and synapsin I mRNA and protein in the hippocampus of microsphere-embolized rats. *Eur J Pharmacol*. 2005;507:49-56.

Angelucci F, Spalletta G, di Iulio F, Ciaramella A, Salani F, Colantoni L, Varsi AE, Gianni W, Sancesario G, Caltagirone C, Bossù P. Alzheimer's disease (AD) and Mild Cognitive Impairment (MCI) patients are characterized by increased BDNF serum levels. *Curr Alzheimer Res*. 2010;7:15-20.

Aydemir O, Deveci A, Taneli F. The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminary study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005;29:261-5.

Bagg S, Pombo AP, Hopman W. Effect of age on functional outcomes after stroke rehabilitation. *Stroke*. 2002;33:179-85.

Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*. 1982;;549-53.

Baron JC, Bousser MG, Comar D, Castaigne P. Crossed cerebellar diaschisis in human supratentorial brain infarction. *Trans Am Neurol Assoc*. 1981;105:459-61.

Bayas A, Hummel V, Kallmann BA, Karch C, Toyka KV, Rieckmann P. Human cerebral endothelial cells are a potential source for bioactive BDNF. *Cytokine* 2002;19:55-58.

Beck T, Lindholm D, Castren E, Wree A. BDNF protects against ischemic cell damage in hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14:689–692.

Begliuomini S, Casarosa E, Pluchino N, Lenzi E, Centofanti M, Freschi L, Pieri M, Genazzani AD, Luisi S, Genazzani AR. Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor. *Hum Reprod*. 2007;22:995-1002.

Begliuomini S, Lenzi E, Ninni F, Casarosa E, Merlini S, Pluchino N, Valentino V, Luisi S, Luisi M, Genazzani AR. Plasma brain-derived neurotrophic factor daily variations in men: correlation with cortisol circadian rhythm. *J Endocrinol* 2008;197:429-435.

Béjot Y, Rouaud O, Durier J, Caillier M, Marie C, Freysz M, Yeguiayan JM, Chantegret A, Osseby G, Moreau T, Giroud M. Decrease in the stroke case fatality rates in a French population-based twenty-year study. A comparison between men and women. *Cerebrovasc Dis*. 2007;24:439-44.

Béjot Y, Touzé E, Osseby GV, Giroud M. Epidémiologie descriptive des AVC. In Mas JL, Bousser MG. « Accident vasculaire cérébral », collection *Traité de Neurologie*, édition Doin 2009a:103-118.

Béjot Y, Osseby GV, Aboa-Eboulé C, Durier J, Lorgis L, Cottin Y, Moreau T, Giroud M. Dijon's vanishing lead with regard to low incidence of stroke. *Eur J Neurol*. 2009b;16:324-9.

Béjot Y, Aouba A, de Peretti C, Grimaud O, Aboa-Eboulé C, Chin F, et al. Time trends in hospital-referred stroke and transient ischemic attack: results of a 7-year nationwide survey in France. *Cerebrovasc Dis* 2010;30:346-54.

Béjot Y, Aboa-Eboulé C, Durier J, Rouaud O, Jacquin A, Ponavoy E, Richard D, Moreau T, Giroud M. Prevalence of early dementia after first-ever stroke: a 24-year population-based study. *Stroke*. 2011a;42:607-12.

Béjot Y, Aboa-Eboulé C, Marie C, Giroud M. Neuroprotective effect of transient ischemic attack. *Presse Med*. 2011b;40:167-72.

Berchtold NC, Castello N, Cotman CW. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*. 2010;167:588-97

Biernaskie J, Corbett D. Enriched rehabilitative training promotes improved forelimb motor function and enhanced dendritic growth after focal ischemic injury. *J Neurosci*. 2001;21:5272-80.

- Binder DK, Croll SD, Gall CM, Scharfman HE. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? *Trends Neurosci.* 2001;24:47-53.
- Black-Schaffer RM, Winston C. Age and functional outcome after stroke. *Top Stroke Rehabil.* 2004;11:23-32.
- Bocchio-Chiavetto L, Bagnardi V, Zanardini R, Molteni R, Nielsen MG, Placentino A, Giovannini C, Rillosi L, Ventriglia M, Riva MA, Gennarelli M. Serum and plasma BDNF levels in major depression: a replication study and meta-analyses. *World J Biol Psychiatry.* 2010;11:763-73.
- Boreas AM, Lodder J, Kessels F, de Leeuw PW, Troost J. Prognostic value of blood pressure in acute stroke. *J Hum Hypertens.* 2002;16:111-6.
- Borroni B, Archetti S, Costanzi C, Grassi M, Ferrari M, Radeghieri A, Caimi L, Caltagirone C, Di Luca M, Padovani A; ITINAD Working Group. Role of BDNF Val66Met functional polymorphism in Alzheimer's disease-related depression. *Neurobiol Aging.* 2009;30:1406-12.
- Bralet AM, Beley A, Beley P, Bralet J. Brain edema and blood-brain barrier permeability following quantitative cerebral microembolism. *Stroke* 1979;10:34-38.
- Bralet J, Beley P, Bralet AM, Beley A. Comparison of the effects of hypertonic glycerol and urea on brain edema, energy metabolism and blood flow following cerebral microembolism in the rat. Deleterious effect of glycerol treatment. *Stroke.* 1983;14:597-604.
- Brigadski T, Hartmann M, Lessmann V. Differential vesicular targeting and time course of synaptic secretion of the mammalian neurotrophins. *J Neurosci.* 2005;25:7601-14.
- Bus BA, Molendijk ML, Penninx BJ, Buitelaar JK, Kenis G, Prickaerts J, Elzinga BM, Voshaar RC. Determinants of serum brain-derived neurotrophic factor. *Psychoneuroendocrinology.* 2011;36:228-39.
- Bütefisch CM, Kleiser R, Seitz RJ. Post-lesional cerebral reorganisation: evidence from functional neuroimaging and transcranial magnetic stimulation. *J Physiol Paris.* 2006;99:437-54
- Calmels P, Defay C, Yvanes-Thomas M, Laporte S, Fayolle-Minon I, Béthoux F, Blanchon MA, Gonthier R. Is very old age a prognostic factor for outcome after a first stroke? *Ann Readapt Med Phys.* 2005;48:675-81.
- Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein HC. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke.* 2001;32:2426-2432.
- Cauraugh JH, Naik SK, Lodha N, Coombes SA, Summers JJ. Long-term rehabilitation for chronic stroke arm movements: a randomized controlled trial. *Clin Rehabil.* 2011. In press
- Carey LM, Abbott DF, Egan GF, O'Keefe GJ, Jackson GD, Bernhardt J, Donnan GA. Evolution of brain activation with good and poor motor recovery after stroke. *Neurorehabil Neural Repair.* 2006;20:24-41.

- Carey LM, Seitz RJ. Functional neuroimaging in stroke recovery and neurorehabilitation: conceptual issues and perspectives. *Int J Stroke*. 2007;2:245-64.
- Celnik P, Paik NJ, Vandermeeren Y, Dimyan M, Cohen LG. Effects of combined peripheral nerve stimulation and brain polarization on performance of a motor sequence task after chronic stroke. *Stroke*. 2009;40:1764-71
- Chen J, Li Y, Chopp M. Intracerebral transplantation of bone marrow with BDNF after MCAo in rat. *Neuropharmacology*. 2000;39:711-6.
- Chen B, Dowlatsahi D, MacQueen GM, Wang JF, Young LT. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. *Biol Psychiatry*. 2001;50:260-5.
- Chen J, Zhang C, Jiang H, Li Y, Zhang L, Robin A, Katakowski M, Lu M, Chopp M. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005;25:281-90.
- Cheng B, Mattson MP. NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res*. 1994;640:56-67.
- Chua MG, Davis SM, Infeld B, Rossiter SC, Tress BM, Hopper JL. Prediction of functional outcome and tissue loss in acute cortical infarction. *Arch Neurol*. 1995;52:496-500.
- Ciammola A, Sassone J, Cannella M, Calza S, Poletti B, Frati L, Squitieri F, Silani V. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of Huntington's disease patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007;144B:574-7.
- Cohen-Cory S, Kidane AH, Shirkey NJ, Marshak S. Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev Neurobiol*. 2010;70:271-88.
- Comelli MC, Guidolin D, Seren MS, Zanoni R, Canella R, Rubini R, Manev H. Time course, localization and pharmacological modulation of immediate early inducible genes, brain-derived neurotrophic factor and trkB messenger RNAs in the rat brain following photochemical stroke. *Neuroscience*. 1993;55:473-90.
- Coppell AL, Pei Q, Zetterström TS. Bi-phasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment. *Neuropharmacology*. 2003;44:903-10.
- Cramer SC, Nelles G, Benson RR, Kaplan JD, Parker RA, Kwong KK, Kennedy DN, Finklestein SP, Rosen BR. A functional MRI study of subjects recovered from hemiparetic stroke. *Stroke*. 1997;28:2518-27.
- Croll SD, Ip NY, Lindsay RM, Wiegand SJ. Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. *Brain Res*. 1998;812:200-8.

- Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*. 2010;3:1.
- Dam M, Tonin P, De Boni A, Pizzolato G, Casson S, Ermani M, Freo U, Piron L, Battistin L. Effects of fluoxetine and maprotiline on functional recovery in poststroke hemiplegic patients undergoing rehabilitation therapy. *Stroke*. 1996;27:1211-4.
- Dassan P, Keir G, Brown MM. Criteria for a clinically informative serum biomarker in acute ischaemic stroke: a review of S100B. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27:295-302.
- Davis SM, Donnan GA, Parsons MW, Levi C, Butcher KS, Peeters A, Barber PA, Bladin C, De Silva DA, Byrnes G, Chalk JB, Fink JN, Kimber TE, Schultz D, Hand PJ, Frayne J, Hankey G, Muir K, Gerraty R, Tress BM, Desmond PM; EPITHET investigators. Effects of alteplase beyond 3 h after stroke in the Echoplanar Imaging Thrombolytic Evaluation Trial (EPITHET): a placebo-controlled randomised trial. *Lancet Neurol*. 2008;7:299-309.
- DeGraba TJ, Hallenbeck JM, Pettigrew KD, Dutka AJ, Kelly BJ. Progression in acute stroke: value of the initial NIH stroke scale score on patient stratification in future trials. *Stroke*. 1999;30:1208-12.
- del Zoppo GJ. Relationship of neurovascular elements to neuron injury during ischemia. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27:65-76.
- Demougeot C, Garnier P, Mossiat C, Bertrand N, Giroud M, Beley A, Marie C. N-Acetylaspartate, a marker of both cellular dysfunction and neuronal loss: its relevance to studies of acute brain injury. *J Neurochem*. 2001;77:408-415.
- Demougeot C, Bertrand N, Prigent-Tessier A, Garnier P, Mossiat C, Giroud M, Marie C, Beley A. Reversible loss of N-acetyl-aspartate in rats subjected to long-term focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:482-9.
- DeVetten G, Coutts SB, Hill MD, Goyal M, Eesa M, O'Brien B, Demchuk AM, Kirton A; MONITOR and VISION study groups. Acute corticospinal tract Wallerian degeneration is associated with stroke outcome. *Stroke*. 2010;41:751-6.
- Di Lazzaro V, Profice P, Pilato F, Dileone M, Florio L, Tonali PA, Angelucci F. BDNF Plasma levels in acute stroke. *Neurosci Lett* 2007;422:128-130.
- Di Lazzaro V, Profice P, Pilato F, Capone F, Ranieri F, Pasqualetti P, Colosimo C, Pravata E, Cianfoni A, Dileone M. Motor cortex plasticity predicts recovery in acute stroke. *Cereb Cortex*. 2010;20:1523-8.
- Di Napoli M, Schwaninger M, Cappelli R, Ceccarelli E, Di Gianfilippo G, Donati C, Emsley HC, Forconi S, Hopkins SJ, Masotti L, Muir KW, Paciucci A, Papa F, Roncacci S, Sander D, Sander K, Smith CJ, Stefanini A, Weber D. Evaluation of C-reactive protein measurement for assessing the risk and prognosis in ischemic stroke: a statement for health care professionals from the CRP Pooling Project members. *Stroke*. 2005;36:1316-29.

- Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use. *Lancet Neurol* 2009;8:398-412.
- Dohle C, Püllen J, Nakaten A, Küst J, Rietz C, Karbe H. Mirror therapy promotes recovery from severe hemiparesis: a randomized controlled trial., *Neurorehabil Neural Repair*. 2009;23:209-17.
- Dromerick AW, Lang CE, Birkenmeier RL, Wagner JM, Miller JP, Videen TO, Powers WJ, Wolf SL, Edwards DF. Very Early Constraint-Induced Movement during Stroke Rehabilitation (VECTORS): A single-center RCT. *Neurology*. 2009;73:195-201.
- Elfving B, Plougmann PH, Müller HK, Mathé AA, Rosenberg R, Wegener G. Inverse correlation of brain and blood BDNF levels in a genetic rat model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 2010a;13:563-572.
- Elfving B, Plougmann PH, Wegener G. Detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat blood and brain preparations using ELISA: pitfalls and solutions. *J Neurosci Methods*. 2010b;187:73-7.
- Elfving B, Plougmann PH, Müller HK, Mathé AA, Rosenberg R, Wegener G. Inverse correlation of brain and blood BDNF levels in a genetic rat model of depression. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2010c;13:563-72.
- Endres M, Fan G, Hirt L, Fujii M, Matsushita K, Liu X, Jaenisch R, Moskowitz MA. Ischemic brain damage in mice after selectively modifying BDNF or NT4 gene expression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:139-44.
- Engelter ST, Provenzale JM, Petrella JR, Alberts MJ. Diffusion MR imaging and transient ischemic attacks. *Stroke* 1999;30:2762-3.
- Erickson KI, Prakash RS, Voss MW, Chaddock L, Heo S, McLaren M, Pence BD, Martin SA, Vieira VJ, Woods JA, McAuley E, Kramer AF. Brain-derived neurotrophic factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. *J Neurosci*. 2010;30:5368-75.
- Ertelt D, Small S, Solodkin A, Dettmers C, McNamara A, Binkofski F, Buccino G. Action observation has a positive impact on rehabilitation of motor deficits after stroke. *Neuroimage*. 2007;36 Suppl 2:T164-73.
- European Stroke Organisation (ESO) Executive Committee; ESO Writing Committee. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *CerebrovascDis* 2008;25:457-507.
- Esteban I, Hannestad J, Levanti B, Del Valle ME, Naves FJ, Vega JA. Neurotrophin receptor proteins immunoreactivity in human gastrointestinal endocrine cells. *Brain Res Bull*. 1995;38:539-43.
- Fahnestock M, Garzon D, Holsinger RM, Michalski B. Neurotrophic factors and Alzheimer's disease: are we focusing on the wrong molecule? *J Neural Transm Suppl*. 2002;62:241-52.

Feeney DM, Gonzalez A, Law WA. Amphetamine, haloperidol, and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science*. 1982;217:855-7.

Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, Anderson CS. Stroke epidemiology: a review of population-based studies of incidence, prevalence and case-fatality in the late 20th century. *Lancet Neurol* 2003;2:43-53.

Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol*. 2009;8:355-69.

Felton TM, Kang TB, Hjorth S, Auerbach SB. Effects of selective serotonin and serotonin/noradrenaline reuptake inhibitors on extracellular serotonin in rat diencephalon and frontal cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2003;367:297-305.

Ferrer I, Marín C, Rey MJ, Ribalta T, Goutan E, Blanco R, Tolosa E, Martí E. BDNF and full-length and truncated TrkB expression in Alzheimer disease. Implications in therapeutic strategies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1999;58:729-39.

Ferris LT, Williams JS, Shen CL. The effect of acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function. *Med Sci Sports Exerc* . 2007;39:728-734.

Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*. 1996;381:706-9.

Finger S, Koehler PJ, Jagella C. The Monakow concept of diaschisis: origins and perspectives. *Arch Neurol*. 2004;61:283-8.

Fiumelli H, Jabaudon D, Magistretti PJ, Martin JL. BDNF stimulates expression, activity and release of tissue-type plasminogen activator in mouse cortical neurons. *Eur J Neurosci*. 1999;11:1639-46.

Fregni F, Boggio PS, Valle AC, Rocha RR, Duarte J, Ferreira MJ, Wagner T, Fecteau S, Rigonatti SP, Riberto M, Freedman SD, Pascual-Leone A. A sham-controlled trial of a 5-day course of repetitive transcranial magnetic stimulation of the unaffected hemisphere in stroke patients. *Stroke*. 2006;37:2115-22.

Fries W, Danek A, Scheidtmann K, Hamburger C. Motor recovery following capsular stroke. Role of descending pathways from multiple motor areas. *Brain*. 1993;116:369-82.

Fuentes B, Castillo J, San José B, Leira R, Serena J, Vivancos J, Dávalos A, Nuñez AG, Egido J, Díez-Tejedor E; Stroke Project of the Cerebrovascular Diseases Study Group, Spanish Society of Neurology. The prognostic value of capillary glucose levels in acute stroke: the GLyemia in Acute Stroke (GLIAS) study. *Stroke*. 2009;40:562-8.

Fujimura H, Altar CA, Chen R, Nakamura T, Nakahashi T, Kambayashi J, Sun B, Tandon NN. Brain-derived neurotrophic factor is stored in human platelets and released by agonist stimulation. *Thromb Haemost*. 2002;87:728-34.

- Galpern WR, Frim DM, Tatter SB, Altar CA, Beal MF, Isacson O. Cell-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor enhances dopamine levels in an MPP+ rat model of substantia nigra degeneration. *Cell Transplant*. 1996;5:225-32.
- German Stroke Study Collaboration. Predicting outcome after acute ischemic stroke: an external validation of prognostic models. *Neurology*. 2004;62:581-5.
- Gladstone DJ, Danells CJ, Black SE. The Fugl-Meyer assessment of motor recovery after stroke: a critical review of its measurement properties. *Neurorehabil Neural Repair*. 2002;16:232-40.
- Gilmour G, Iversen SD, O'Neill MF, O'Neill MJ, Ward MA, Bannerman DM. Amphetamine promotes task-dependent recovery following focal cortical ischaemic lesions in the rat. *Behav Brain Res*. 2005;165:98-109.
- Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology*. 2008;55:363-89.
- Gold SM, Schulz KH, Hartmann S, Mladek M, Lang UE, Hellweg R, Reer R, Braumann KM, Heesen C. Basal serum levels and reactivity of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor to standardized acute exercise in multiple sclerosis and controls. *J Neuroimmunol* 2003;138:99-105.
- Golden E, Emiliano A, Maudsley S, Windham BG, Carlson OD, Egan JM, Driscoll I, Ferrucci L, Martin B, Mattson MP. Circulating brain-derived neurotrophic factor and indices of metabolic and cardiovascular health: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *PLoS One*. 2010;5:e10099.
- Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat O, Eker C, Vahip S. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2005;255:381-6.
- Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL. New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. *J Neurosci*. 2009;29:12764-7.
- Greer DM, Funk SE, Reaven NL, Ouzounelli M, Uman GC. Impact of fever on outcome in patients with stroke and neurologic injury: a comprehensive meta-analysis. *Stroke*. 2008;39:3029-35.
- Griffin EW, Mulally S, Foley C, Warmington SA, O'Mara SM, Kelly AM. Aerobic exercise improves hippocampal function and increases BDNF in the serum of young adult males. *Physiol Behav*. 2011; in press
- Gualandris A, Jones TE, Strickland S, Tsirka SE. Membrane depolarization induces calcium-dependent secretion of tissue plasminogen activator. *J Neurosci*. 1996;16:2220-5.
- Guedry S, Marie C, Rochette L, Bralet J. Beneficial effect of 1,3-butanediol on cerebral energy metabolism and edema following brain embolization in rats. *Stroke*. 1990;21:1458-63.
- Guo S, Kim WJ, Lok J, Lee SR, Besancon E, Luo BH, Stins MF, Wang X, Dedhar S, Lo EH. Neuroprotection via matrix-trophic coupling between cerebral endothelial cells and neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:7582-7.

- Haapasalo A, Sipola I, Larsson K, Akerman KE, Stoilov P, Stamm S, Wong G, Castren E. Regulation of TRKB surface expression by brain-derived neurotrophic factor and truncated TRKB isoforms. *J Biol Chem.* 2002;277:43160-7.
- Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, Brott T, Frankel M, Grotta JC, Haley EC Jr, Kwiatkowski T, Levine SR, Lewandowski C, Lu M, Lyden P, Marler JR, Patel S, Tilley BC, Albers G, Bluhmki E, Wilhelm M, Hamilton S; ATLANTIS Trials Investigators; ECASS Trials Investigators; NINDS rt-PA Study Group Investigators. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet.* 2004;363:768-74.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D; ECASS Investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2008;359:1317-29.
- Hagg T. Neurotrophins prevent death and differentially affect tyrosine hydroxylase of adult rat nigrostriatal neurons in vivo. *Exp Neurol.* 1998;149:183-92.
- Hallett M. Transcranial magnetic stimulation: a primer. *Neuron.* 2007;55:187-99.
- Hankey GJ, Warlow CP. Treatment and secondary prevention of stroke: evidence, costs, and effects on individuals and populations. *Lancet* 1999;354:1457-1463.
- Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana BS, Callicott JH, Egan MF, Weinberger DR. Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci.* 2003;23:6690-4.
- Hashimoto R, Moriguchi Y, Yamashita F, Mori T, Nemoto K, Okada T, Hori H, Noguchi H, Kunugi H, Ohnishi T. Dose-dependent effect of the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene on memory-related hippocampal activity. *Neurosci Res.* 2008;61:360-7.
- Heerssen HM, Segal RA. Location, location, location: a spatial view of neurotrophin signal transduction. *Trends Neurosci.* 2002;25:160-5.
- Henderson A, Korner-Bitensky N, Levin M. Virtual reality in stroke rehabilitation: a systematic review of its effectiveness for upper limb motor recovery. *Top Stroke Rehabil.* 2007;14:52-61.
- Hock C, Heese K, Hulette C, Rosenberg C, Otten U. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. *Arch Neurol.* 2000;57:846-51.
- Holsinger RM, Schnarr J, Henry P, Castelo VT, Fahnestock M. Quantitation of BDNF mRNA in human parietal cortex by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction: decreased levels in Alzheimer's disease. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000;76:347-54.

- Hoshaw BA, Malberg JE, Lucki I. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effects. *Brain Res.* 2005;1037:204-8.
- Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ, Donnan GA. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol.* 2000;166:127-35.
- Hu Y, Russek SJ. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation. *J Neurochem.* 2008;105:1-17.
- Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:609-42.
- Hyvärinen M, Qiao Q, Tuomilehto J, Laatikainen T, Heine RJ, Stehouwer CD, Alberti KG, Pyörälä K, Zethelius B, Stegmayr B; DECODE Study Group. Hyperglycemia and stroke mortality: comparison between fasting and 2-h glucose criteria. *Diabetes Care.* 2009;32:348-354.
- Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5:347-60.
- Irle E. Lesion size and recovery of function: some new perspectives. *Brain Res.* 1987;434:307-20.
- Jean YY, Lercher LD, Dreyfus CF. Glutamate elicits release of BDNF from basal forebrain astrocytes in a process dependent on metabotropic receptors and the PLC pathway. *Neuron Glia Biol.* 2008;4:35-42.
- Jensen MB, Yoo B, Clarke WR, Davis PH, Adams HR Jr. Blood pressure as an independent prognostic factor in acute ischemic stroke. *Can J Neurol Sci.* 2006;33:34-8.
- Jiang Q, Zhang ZG, Chopp M. MRI evaluation of white matter recovery after brain injury. *Stroke.* 2010;41:S112-3.
- Jiang Y, Wei N, Lu T, Zhu J, Xu G, Liu X. Intranasal brain-derived neurotrophic factor protects brain from ischemic insult via modulating local inflammation in rats. *Neuroscience.* 2011;172:398-405.
- Jiménez I, Sobrino T, Rodríguez-Yáñez M, Pouso M, Cristobo I, Sabucedo M, Blanco M, Castellanos M, Leira R, Castillo J. High serum levels of leptin are associated with post-stroke depression. *Psychol Med.* 2009;39:1201-9.
- Johansson BB. Current trends in stroke rehabilitation. A review with focus on brain plasticity. *Acta Neurol Scand.* 2011;123:147-59.
- Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Vive-Larsen J, Støier M, Olsen TS. Outcome and time course of recovery in stroke. Part II: Time course of recovery. The Copenhagen Stroke Study. *Arch Phys Med Rehabil.* 1995;76:406-12.
- Jorgensen HS, Nakayama H, Reith J, Raaschou HO, Olsen TS. Acute stroke with atrial fibrillation. The Copenhagen Stroke Study. *Stroke.* 1996;27:1765-9.

- Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, Konnerth A. Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature*. 1999;401:918-21.
- Kallmünzer B, Kollmar R. Temperature management in stroke - an unsolved, but important topic. *Cerebrovasc Dis*. 2011;31:532-43
- Karege F, Schwald M, Cisse M. Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci Lett*. 2002;328:261-4.
- Karege F, Vaudan G, Schwald M, Perroud N, La Harpe R. Neurotrophin levels in postmortem brains of suicide victims and the effects of antemortem diagnosis and psychotropic drugs. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005;136:29-37.
- Kataoka K, Hayakawa T, Yamada K, Mushiroi T, Kuroda R, Mogami H. Neuronal network disturbance after focal ischemia in rats. *Stroke*. 1989;20:1226-35.
- Katoh-Semba R, Takeuchi IK, Semba R, Kato K. Distribution of brain-derived neurotrophic factor in rats and its changes with development in the brain. *J Neurochem*. 1997;69:34-42.
- Kawamoto Y, Nakamura S, Nakano S, Oka N, Akiguchi I, Kimura J. Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in adult rat brain. *Neuroscience*. 1996;74:1209-26.
- Ke Z, Yip SP, Li L, Zheng XX, Tong KY. The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on brain-derived neurotrophic factor and motor function recovery: a rat brain ischemia model. *PLoS One*. 2011;6:e16643.
- Keiner S, Witte OW, Redecker C. 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*. 2009;68:83-93.
- Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R. Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med*. 1999;189(5):865-70.
- Khedr EM, Ahmed MA, Fathy N, Rothwell JC. Therapeutic trial of repetitive transcranial magnetic stimulation after acute ischemic stroke. *Neurology*. 2005;65:466-8.
- Khedr EM, Etraby AE, Hemeda M, Nasef AM, Razek AA. Long-term effect of repetitive transcranial magnetic stimulation on motor function recovery after acute ischemic stroke. *Acta Neurol Scand*. 2010;121:30-7
- Kim MW, Bang MS, Han TR, Ko YJ, Yoon BW, Kim JH, Kang LM, Lee KM, Kim MH. Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Res*. 2005;1052:16-21.

- Kiprianova I, Sandkühler J, Schwab S, Hoyer S, Spranger M. Brain-derived neurotrophic factor improves long-term potentiation and cognitive functions after transient forebrain ischemia in the rat. *Exp Neurol*. 1999;159:511-9.
- Kluding PM, Tseng BY, Billinger SA. Exercise and executive function in individuals with chronic stroke: a pilot study. *J Neurol Phys Ther*. 2011;35:11-7.
- Kokaia Z, Zhao Q, Kokaia M, Elmér E, Metsis M, Smith ML, Siesjö BK, Lindvall O. Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp Neurol*. 1995;136:73-88.
- Kokaia Z, Nawa H, Uchino H, Elmér E, Kokaia M, Carnahan J, Smith ML, Siesjö BK, Lindvall O. Regional brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein levels following transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996;38:139-44.
- Kokaia Z, Andsberg G, Yan Q, Lindvall O. Rapid alterations of BDNF protein levels in the rat brain after focal ischemia: evidence for increased synthesis and anterograde axonal transport. *Exp Neurol*. 1998;154:289-301.
- Korte M, Carroll P, Wolf E, Brem G, Thoenen H, Bonhoeffer T. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:8856-60.
- Krizsan-Agbas D, Pedchenko T, Hasan W, Smith PG. Oestrogen regulates sympathetic neurite outgrowth by modulating brain derived neurotrophic factor synthesis and release by the rodent uterus. *Eur J Neurosci* 2003;18:2760-2768.
- Kugler C, Altenhöner T, Lochner P, Ferbert A; Hessian Stroke Data Bank Study Group ASH. Does age influence early recovery from ischemic stroke? A study from the Hessian Stroke Data Bank. *J Neurol*. 2003;250:676-81.
- Küppers E, Beyer C. Dopamine regulates brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in cultured embryonic mouse striatal cells. *Neuroreport*. 2001;12:1175-9.
- Kwakkel G, Kollen BJ, Krebs HI. Effects of robot-assisted therapy on upper limb recovery after stroke: a systematic review. *Neurorehabil Neural Repair*. 2008;22:111-21
- Kwan J, Hand P. Early neurological deterioration in acute stroke: clinical characteristics and impact on outcome. *QJM*. 2006;99:625-33.
- Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Wittorf A, Richartz E, Bartels M, Buchkremer G, Schott K. Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *J Neural Transm*. 2006;113:1217-24.
- Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Maetzler W, Wittorf A, Soekadar S, Richartz E, Koehler N, Bartels M, Buchkremer G, Schott K. BDNF serum and CSF concentrations in Alzheimer's disease, normal pressure hydrocephalus and healthy controls. *J Psychiatr Res*. 2007;41:387-94.

- Lai AY, Todd KG. Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia*. 2008;56:259-70.
- Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 2001;294:1945-8.
- Lee TH, Kato H, Chen ST, Kogure K, Itoyama Y. Expression disparity of brain-derived neurotrophic factor immunoreactivity and mRNA in ischemic hippocampal neurons. *Neuroreport*. 2002;13:2271-5.
- Lee J, Fukumoto H, Orne J, Klucken J, Raju S, Vanderburg CR, Irizarry MC, Hyman BT, Ingelsson M. Decreased levels of BDNF protein in Alzheimer temporal cortex are independent of BDNF polymorphisms. *Exp Neurol*. 2005;194:91-6.
- Lee CH, Park JH, Yoo KY, Choi JH, Hwang IK, Ryu PD, Kim DH, Kwon YG, Kim YM, Won MH. Pre- and post-treatments with escitalopram protect against experimental ischemic neuronal damage via regulation of BDNF expression and oxidative stress. *Exp Neurol*. 2011;229:450-9.
- Lemesle M, Walker P, Guy F, D'Athis P, Billiar T, Giroud M, Demougeot C, Lalande A, Baudouin N, Martin D, Brunotte F. Multi-variate analysis predicts clinical outcome 30 days after middle cerebral artery infarction. *Acta Neurol Scand*. 2000;102:11-7.
- Lenzi GL, Altieri M, Maestrini I. Post-stroke depression. *Rev Neurol (Paris)*. 2008;164:837-40.
- Leonardi-Bee J, Bath PM, Phillips SJ, Sandercock PA; IST Collaborative Group. Blood pressure and clinical outcomes in the International Stroke Trial. *Stroke*. 2002;33:1315-20.
- Lessmann V, Gottmann K, Malsangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol*. 2003;69:341-74.
- Lessmann V, Brigadski T. Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci Res*. 2009;65:11-22.
- Levivier M, Przedborski S, Bencsics C, Kang UJ. Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*. 1995;15:7810-20.
- Levy DE. How transient are transient ischemic attacks? *Neurology* 1988;38:674-7.
- Leyhe T, Stransky E, Eschweiler GW, Buchkremer G, Laske C. Increase of BDNF serum concentration during donepezil treatment of patients with early Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*. 2008;258:124-8.
- Leys D, Béjot Y, Debette S, Giroud M. Burden of stroke in France. *Int J Stroke* 2008;3:117-9.
- Liepert J, Miltner WH, Bauder H, Sommer M, Dettmers C, Taub E, Weiller C. Motor cortex plasticity during constraint-induced movement therapy in stroke patients. *Neurosci Lett*. 1998;250:5-8.

- Liepert J, Storch P, Fritsch A, Weiller C. Motor cortex disinhibition in acute stroke. *Clin Neurophysiol.* 2000a;111:671-6.
- Liepert J, Bauder H, Wolfgang HR, Miltner WH, Taub E, Weiller C. Treatment-induced cortical reorganization after stroke in humans. *Stroke.* 2000b;31:1210-6.
- Liepert J. Pharmacotherapy in restorative neurology. *Curr Opin Neurol.* 2008;21:639-43.
- Lindefors N, Ernfors P, Falkenberg T, Persson H. Septal cholinergic afferents regulate expression of brain-derived neurotrophic factor and beta-nerve growth factor mRNA in rat hippocampus. *Exp Brain Res.* 1992;88:78-90.
- Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, Kokaia Z, Smith ML, Siesjö BK, Persson H. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:648-52.
- Lim CM, Kim SW, Park JY, Kim C, Yoon SH, Lee JK. Fluoxetine affords robust neuroprotection in the postischemic brain via its anti-inflammatory effect. *J Neurosci Res.* 2009;87:1037-45.
- Lin PY, Lin SI, Penney T, Chen JJ. Applications of near infrared spectroscopy and imaging for motor rehabilitation in stroke patients. *J Med Biol Engineering.* 2009;29:210-21.
- Lin KC, Chen YA, Chen CL, Wu CY, Chang YF. The effects of bilateral arm training on motor control and functional performance in chronic stroke: a randomized controlled study. *Neurorehabil Neural Repair.* 2010;24:42-51.
- Lommatzsch M, Zingler D, Schuhbaeck K, Schloetcke K, Zingler C, Schuff-Werner P, Virchow JC. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. *Neurobiol Aging.* 2005;26:115-23.
- Lövblad KO, Baird AE, Schlaug G, Benfield A, Siewert B, Voetsch B, Connor A, Burzynski C, Edelman RR, Warach S. Ischemic lesion volumes in acute stroke by diffusion-weighted magnetic resonance imaging correlate with clinical outcome. *Ann Neurol.* 1997;42:164-70.
- Lu B. BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem.* 2003;10:86-98.
- Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6:603-14.
- Luk JK, Cheung RT, Ho SL, Li L. Does age predict outcome in stroke rehabilitation? A study of 878 Chinese subjects. *Cerebrovasc Dis.* 2006;21:229-34.
- Luo KR, Hong CJ, Liou YJ, Hou SJ, Huang YH, Tsai SJ. Differential regulation of neurotrophin S100B and BDNF in two rat models of depression. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2010;34:1433-1439.

- Macko RF, Ivey FM, Forrester LW, Hanley D, Sorkin JD, Katzel LI, Silver KH, Goldberg AP. Treadmill exercise rehabilitation improves ambulatory function and cardiovascular fitness in patients with chronic stroke: a randomized, controlled trial. *Stroke*. 2005;36:2206-11.
- Maclin EL, Rose DF, Knight JE, Orrison WW, Davis LE. Somatosensory evoked magnetic fields in patients with stroke. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*. 1994;91:468-75.
- Madinier A, Bertrand N, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Beley A, Marie C, Garnier P. Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats. *PLoS One*. 2009;4:e8101.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 2000;20:9104-10.
- Mannari C, Origlia N, Scatena A, Del Debbio A, Catena M, Dell'agnello G, Barraco A, Giovannini L, Dell'osso L, Domenici L, Piccinni A. BDNF level in the rat prefrontal cortex increases following chronic but not acute treatment with duloxetine, a dual acting inhibitor of noradrenaline and serotonin re-uptake. *Cell Mol Neurobiol* 2008;28:457-468.
- Mansur CG, Fregni F, Boggio PS, Riberto M, Gallucci-Neto J, Santos CM, Wagner T, Rigonatti SP, Marcolin MA, Pascual-Leone A. A sham stimulation-controlled trial of rTMS of the unaffected hemisphere in stroke patients. *Neurology*. 2005;64:1802-4.
- Martinsson L, Hårdemark H, Eksborg S. Amphetamines for improving recovery after stroke. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;CD002090.
- Mathew RJ, Wilson WH. Dextroamphetamine-induced changes in regional cerebral blood flow. *Psychopharmacology (Berl)*. 1985;87:298-302.
- Matsumoto T, Rauskolb S, Polack M, Klose J, Kolbeck R, Korte M, Barde YA. Biosynthesis and processing of endogenous BDNF: CNS neurons store and secrete BDNF, not pro-BDNF. *Nat Neurosci*. 2008;11:131-3.
- Matthews VB, Aström MB, Chan MH, Bruce CR, Krabbe KS, Prelovsek O, Akerström T, Yfanti C, Broholm C, Mortensen OH, Penkowa M, Hojman P, Zankari A, Watt MJ, Bruunsgaard H, Pedersen BK, Febbraio MA. Brain-derived neurotrophic factor is produced by skeletal muscle cells in response to contraction and enhances fat oxidation via activation of AMP-activated protein kinase. *Diabetologia*. 2009;52:1409-18.
- Maya Vetencourt JF, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, O'Leary OF, Castrén E, Maffei L. The antidepressant fluoxetine restores plasticity in the adult visual cortex. *Science*. 2008;320:385-8.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:295-318.
- Miklic S, Juric DM, Carman-Krzan M. Differences in the regulation of BDNF and NGF synthesis in cultured neonatal rat astrocytes. *Int J Dev Neurosci*. 2004;22:119-30.

- Millerot E, Prigent-Tessier AS, Bertrand NM, Faure PJ, Mossiat CM, Giroud ME, Beley AG, Marie C. Serum ferritin in stroke: a marker of increased body iron stores or stroke severity? *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25:1386-93
- Mogi M, Togari A, Kondo T, Mizuno Y, Komure O, Kuno S, Ichinose H, Nagatsu T. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 1999;270:45-8.
- Moseley AM, Stark A, Cameron ID, Pollock A. Treadmill training and body weight support for walking after stroke. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005;4:CD002840
- Müller HD, Hanumanthiah KM, Diederich K, Schwab S, Schäbitz WR, Sommer C. Brain-derived neurotrophic factor but not forced arm use improves long-term outcome after photothrombotic stroke and transiently upregulates binding densities of excitatory glutamate receptors in the rat brain. *Stroke.* 2008;39:1012-21.
- Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10:861-72.
- Murray KD, Gall CM, Jones EG, Isackson PJ. Differential regulation of brain-derived neurotrophic factor and type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase messenger RNA expression in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 1994;60:37-48.
- Nagappan G, Zaitsev E, Senatorov VV Jr, Yang J, Hempstead BL, Lu B. Control of extracellular cleavage of ProBDNF by high frequency neuronal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:1267-72.
- Nakahashi T, Fujimura H, Altar CA, Li J, Kambayashi J, Tandon NN, Sun B. Vascular endothelial cells synthesize and secrete brain-derived neurotrophic factor. *FEBS Lett.* 2000;470:113-7.
- Narantuya D, Nagai A, Sheikh AM, Masuda J, Kobayashi S, Yamaguchi S, Kim SU. Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement. *PLoS One.* 2010;5:e11746.
- Nemoto K, Fukamachi K, Nemoto F, Miyata S, Hamada M, Nakamura Y, Senba E, Ueyama T. Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245:284-8.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci.* 1995;15:7539-47.
- Nilupul Perera M, Ma HK, Arakawa S, Howells DW, Markus R, Rowe CC, Donnan GA. Inflammation following stroke. *J Clin Neurosci.* 2006;13:1-8.
- Nofuji Y, Suwa M, Moriyama Y, Nakano H, Ichimiya A, Nishichi R, Sasaki H, Radak Z, Kumagai S. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor in trained men. *Neurosci Lett.* 2008;437:29-32.

- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J Neurocytol.* 1989;18:311-8.
- Nuutinen J, Liu Y, Laakso MP, Karonen JO, Roivainen R, Vanninen RL, Partanen K, Østergaard L, Sivenius J, Aronen HJ. Assessing the outcome of stroke: a comparison between MRI and clinical stroke scales. *Acta Neurol Scand.* 2006;113:100-7.
- Nygren J, Kokaia M, Wieloch T. Decreased expression of brain-derived neurotrophic factor in BDNF(+/-) mice is associated with enhanced recovery of motor performance and increased neuroblast number following experimental stroke. *J Neurosci Res.* 2006;84:626-31.
- Oppenheim C, Naggara O, Hamon M, Gauvrit JY, Rodrigo S, Bienvenu M, Ménégon P, Cosnard G, Meder JF. Imagerie par résonance magnétique de diffusion de l'encéphale chez l'adulte : technique, résultats normaux et pathologiques. *EMC Radiologie* 2005;133-164.
- Ottenbacher KJ, Jannell S. The results of clinical trials in stroke rehabilitation research. *Arch Neurol.* 1993;50:37-44.
- Ozçelik T, Rosenthal A, Francke U. Chromosomal mapping of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 genes in man and mouse. *Genomics.* 1991;10:569-75.
- Page SJ, Levine P, Leonard A. Mental practice in chronic stroke: results of a randomized, placebo-controlled trial. *Stroke.* 2007;38:1293-7.
- Pan W, Banks WA, Fasold MB, Bluth J, Kastin AJ. Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology.* 1998;37:1553-61.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, et al. Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* 2004;306:487-91.
- Paolucci S, Antonucci G, Grasso MG, Morelli D, Troisi E, Coiro P, Bragoni M. Early versus delayed inpatient stroke rehabilitation: a matched comparison conducted in Italy. *Arch Phys Med Rehabil.* 2000;81:695-700.
- Papadopoulos CM, Tsai SY, Guillen V, Ortega J, Kartje GL, Wolf WA. Motor recovery and axonal plasticity with short-term amphetamine after stroke. *Stroke.* 2009;40:294-302.
- Parain K, Murer MG, Yan Q, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport.* 1999;10:557-61.
- Pariente J, Loubinoux I, Carel C, Albucher JF, Leger A, Manelfe C, Rascol O, Chollet F. Fluoxetine modulates motor performance and cerebral activation of patients recovering from stroke. *Ann Neurol.* 2001;50:718-29.

- Patel AT, Duncan PW, Lai SM, Studenski S. The relation between impairments and functional outcomes poststroke. *Arch Phys Med Rehabil.* 2000;81:1357-63.
- Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron.* 1996;16:1137-45.
- Pearson-Fuhrhop KM, Kleim JA, Cramer SC. Brain plasticity and genetic factors. *Top Stroke Rehabil.* 2009;16:282-99.
- Pendlebury ST, Rothwell PM. Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* 2009;8:1006-1018.
- Peng S, Wu J, Mufson EJ, Fahnestock M. Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2005;93:1412-21.
- Pereira AC, Saunders DE, Doyle VL, Bland JM, Howe FA, Griffiths JR, Brown MM. Measurement of initial N-acetyl aspartate concentration by magnetic resonance spectroscopy and initial infarct volume by MRI predicts outcome in patients with middle cerebral artery territory infarction. *Stroke.* 1999;30:1577-82.
- Pezawas L, Verchinski BA, Mattay VS, Callicott JH, Kolachana BS, Straub RE, Egan MF, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR. The brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism and variation in human cortical morphology. *J Neurosci.* 2004;24:10099-102.
- Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Doré JJ, Corbett D. Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke.* 2009;40:1490-5.
- Plow EF, Herren T, Redlitz A, Miles LA, Hoover-Plow JL. The cell biology of the plasminogen system. *FASEB J.* 1995;9:939-45.
- Poduslo JF, Curran GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res.* 1996;36:280-6.
- Qin L, Kim E, Ratan R, Lee FS, Cho S. Genetic variant of BDNF (Val66Met) polymorphism attenuates stroke-induced angiogenic responses by enhancing anti-angiogenic mediator CD36 expression. *J Neurosci.* 2011;31:775-83.
- Quinn TJ, Lees KR. Hyperglycaemia in acute stroke--to treat or not to treat *Cerebrovasc Dis.* 2009;27 Suppl 1:148-55.
- Radka SF, Holst PA, Fritsche M, Altar CA. Presence of brain-derived neurotrophic factor in brain and human and rat but not mouse serum detected by a sensitive and specific immunoassay. *Brain Res.* 1996;709:122-301.

- Rasmussen P, Brassard P, Adser H, Pedersen MV, Leick L, Hart E, Secher NH, Pedersen BK, Pilegaard H. Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. *Exp Physiol*. 2009;94:1062-9.
- Rasmusson AM, Shi L, Duman R. Downregulation of BDNF mRNA in the hippocampal dentate gyrus after re-exposure to cues previously associated with footshock. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27:133-42.
- Rickhag M, Teilmann M, Wieloch T. 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*. 2007;1151:203-10.
- Rizzolatti G, Craighero L. The mirror-neuron system. *Annu Rev Neurosci*. 2004;27:169-92.
- Robinson TG, Dawson SL, Ahmed U, Manktelow B, Fotherby MD, Potter JF. Twenty-four hour systolic blood pressure predicts long-term mortality following acute stroke. *J Hypertens*. 2001;19:2127-34.
- Rosenfeld RD, Zeni L, Haniu M, Talvenheimo J, Radka SF, Bennett L, Miller JA, Welcher AA. Purification and identification of brain-derived neurotrophic factor from human serum. *Protein Expr Purif*. 1995;6:465-71.
- Rossi S, Cappa SF, Babiloni C, Pasqualetti P, Miniussi C, Carducci F, Babiloni F, Rossini PM. Prefrontal cortex in long-term memory: an "interference" approach using magnetic stimulation. *Nat Neurosci*. 2001;4:948-52.
- Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW. Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology*. 1999;21:679-82.
- Saarelainen T, Hendolin P, Lucas G, Koponen E, Sairanen M, MacDonald E, Agerman K, Haapasalo A, Nawa H, Aloyz R, Ernfors P, Castrén E. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci*. 2003;23:349-57.
- Saha RN, Liu X, Pahan K. Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: a case for the neuroprotective role of cytokine. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006;1:212-22.
- Sato Y, Chin Y, Kato T, Tanaka Y, Tozuka Y, Mase M, Ageyama N, Ono F, Terao K, Yoshikawa Y, Hisatsune T. White matter activated glial cells produce BDNF in a stroke model of monkeys. *Neurosci Res*. 2009;65:71-8.
- Saunders DE, Clifton AG, Brown MM. Measurement of infarct size using MRI predicts prognosis in middle cerebral artery infarction. *Stroke*. 1995;26:2272-6.
- Saver JL, Johnston KC, Homer D, Wityk R, Koroshetz W, Truskowski LL, Haley EC. Infarct volume as a surrogate or auxiliary outcome measure in ischemic stroke clinical trials. The RANTTAS Investigators. *Stroke*. 1999;30:293-8.

- Scalzo P, Kümmer A, Bretas TL, Cardoso F, Teixeira AL. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. *J Neurol*. 2010;257:540-5.
- Schäbitz WR, Schwab S, Spranger M, Hacke W. Intraventricular BDNF reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:500–508.
- Schäbitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2000;31:2212-7.
- Schäbitz WR, Berger C, Kollmar R, Seitz M, Tanay E, Kiessling M, Schwab S, Sommer C. Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. *Stroke*. 2004;35:992-7.
- Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, Kuhn HG. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke*. 2007;38:2165-72.
- Schaechter JD. Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke. *Prog Neurobiol*. 2004;73:61-72.
- Schiemanck SK, Post MW, Kwakkel G, Witkamp TD, Kappelle LJ, Prevo AJ. Ischemic lesion volume correlates with long-term functional outcome and quality of life of middle cerebral artery stroke survivors. *Restor Neurol Neurosci*. 2005;23:257-63.
- Schmidt HD, Duman RS. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35:2378-91.
- Scott JF, Robinson GM, French JM, O'Connell JE, Alberti KG, Gray CS. Prevalence of admission hyperglycaemia across clinical subtypes of acute stroke. *Lancet*. 1999;353:376-377.
- Seitz RJ, Azari NP, Knorr U, Binkofski F, Herzog H, Freund HJ. The role of diaschisis in stroke recovery. *Stroke*. 1999;30:1844-50.
- Shah MV. Rehabilitation of the older adult with stroke. *Clin Geriatr Med*. 2006 May;22(2):469-89; xi.
- Shelton FD, Volpe BT, Reding M. Motor impairment as a predictor of functional recovery and guide to rehabilitation treatment after stroke. *Neurorehabil Neural Repair*. 2001;15:229-37.
- Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, Russell DS, Duman RS. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J Neurosci*. 2002;22:3251-61.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*. 1995;15:1768-77.

Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE. Enhanced neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery with D-amphetamine therapy after neocortical infarction in rats. *Stroke*. 1998;29:2381-93;

Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world. *Lancet Neurol* 2007;6:182-187.

Stroke Unit Trialists' Collaboration. Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;4:CD000197.

Sulejczak D, Ziemlińska E, Czarkowska-Bauch J, Nosecka E, Strzalkowski R, Skup M.J Focal photothrombotic lesion of the rat motor cortex increases BDNF levels in motor-sensory cortical areas not accompanied by recovery of forelimb motor skills. *Neurotrauma*. 2007;24:1362-77.

Sumer M, Ozdemir I, Erturk O. Progression in acute ischemic stroke: frequency, risk factors and prognosis. *J Clin Neurosci*. 2003;10:177-80.

Takeda A, Onodera H, Sugimoto A, Kogure K, Obinata M, Shibahara S. Coordinated expression of messenger RNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience*. 1993;55:23-31.

Takeuchi N, Chuma T, Matsuo Y, Watanabe I, Ikoma K. Repetitive transcranial magnetic stimulation of contralesional primary motor cortex improves hand function after stroke. *Stroke*. 2005;36:2681-6.

Tanaka Y, Tanaka R, Liu M, Hattori N, Urabe T. Cilostazol attenuates ischemic brain injury and enhances neurogenesis in the subventricular zone of adult mice after transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2010;171:1367-76

Tapia-Arancibia L, Rage F, Givalois L, Arancibia S. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol*. 2004;25:77-107.

Tecchio F, Rossini PM, Pizzella V, Cassetta E, Romani GL. Spatial properties and interhemispheric differences of the sensory hand cortical representation: a neuromagnetic study. *Brain Res*. 1997;767:100-8.

Tei H, Uchiyama S, Usui T. Predictors of good prognosis in total anterior circulation infarction within 6 h after onset under conventional therapy. *Acta Neurol Scand*. 2006;113:301-6.

Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci* 2005;25:5455–63.

Tongiorgi E. Activity-dependent expression of brain-derived neurotrophic factor in dendrites: facts and open questions. *Neurosci Res*. 2008;61:335-46.

Tsukahara T, Yonekawa Y, Tanaka K, Ohara O, Watanabe S, Kimura T, Nishijima T, Taniguchi T. The role of BDNF in transient forebrain ischemia in the rat brain. *Neurosurgery*. 1994;34:323–330.

- Tsukahara T, Takeda M, Shimohama S, Ohara O, Hashimoto N. Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in monkeys. *Neurosurgery*. 1995;37:733-9.
- Tsukahara T, Iihara K, Hashimoto N, Nishijima T, Taniguchi T. Increases in levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and its promoters after transient forebrain ischemia in the rat brain. *Neurochem Int*. 1998;33:201-7.
- Uchida H, Yokoyama H, Kimoto H, Kato H, Araki T. Long-term changes in the ipsilateral substantia nigra after transient focal cerebral ischaemia in rats. *Int J Exp Pathol*. 2010;91:256-66.
- Vaidya VA, Marek GJ, Aghajanian GK, Duman RS. 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J Neurosci*. 1997;17:2785-95.
- Vega SR, Struder HK, Wahrmann BV, Schmidt A, Bloch W, Hollmann W. Acute BDNF and cortisol response to low intensity exercise and following ramp incremental exercise to exhaustion in humans. *Brain Res*. 2006;1121:59-65.
- Verhagen M, van der Meij A, van Deurzen PA, Janzing JG, Arias-Vásquez A, Buitelaar JK, Franke B. Meta-analysis of the BDNF Val66Met polymorphism in major depressive disorder: effects of gender and ethnicity *Mol Psychiatry*. 2010;15:260-71.
- Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*. 2004;35:1732-7
- Wang H, Ward N, Boswell M, Katz DM. Secretion of brain-derived neurotrophic factor from brain microvascular endothelial cells. *Eur J Neurosci*. 2006;23:1665-70.
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol*. 2007;184:53-68.
- Ward NS. Functional reorganization of the cerebral motor system after stroke. *Curr Opin Neurol*. 2004;17:725-30.
- Wassermann EM, McShane LM, Hallett M, Cohen LG. Noninvasive mapping of muscle representations in human motor cortex. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1992;85:1-8
- Waterhouse EG, Xu B. New insights into the role of brain-derived neurotrophic factor in synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci*. 2009;42:81-9.
- Weimar C, König IR, Kraywinkel K, Ziegler A, Diener HC; German Stroke Study Collaboration. Age and National Institutes of Health Stroke Scale Score within 6 hours after onset are accurate predictors of outcome after cerebral ischemia: development and external validation of prognostic models. *Stroke*. 2004;35:158-62.

- Weisberg LA. Clinical characteristics of transient ischemic attacks in black patients. *Neurology* 1991;41:1410-4.
- Whiteley W, Jackson C, Lewis S, Lowe G, Rumley A, Sandercock P, Wardlaw J, Dennis M, Sudlow C. Inflammatory markers and poor outcome after stroke: a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6. *PLoS Med.* 2009;6:e1000145.
- WHO. The world health report 2000: Health systems improving performance. Geneva: WHO, 2000.
- Willmot M, Leonardi-Bee J, Bath PMW. High blood pressure in acute stroke and subsequent outcome. A systematic review. *Hypertension* 2004;43:18-24.
- Windle V, Corbett D. Fluoxetine and recovery of motor function after focal ischemia in rats. *Brain Res.* 2005;1044:25-32.
- Witte OW. Lesion-induced plasticity as a potential mechanism for recovery and rehabilitative training. *Curr Opin Neurol.* 1998;11:655-62.
- Wolf SL. Revisiting constraint-induced movement therapy: are we too smitten with the mitten? Is all nonuse "learned"? and other quandaries. *Phys Ther.* 2007;87:1212-23.
- Wolf SL, Winstein CJ, Miller JP, Thompson PA, Taub E, Uswatte G, Morris D, Blanton S, Nichols-Larsen D, Clark PC. Retention of upper limb function in stroke survivors who have received constraint-induced movement therapy: the EXCITE randomised trial. *Lancet Neurol.* 2008;7:33-40.
- Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B. Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. *Nat Neurosci.* 2005;8:1069-77.
- Wu D, Pardridge WM. Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:254-259.
- Xu B, Gottschalk W, Chow A, Wilson RI, Schnell E, Zang K, Wang D, Nicoll RA, Lu B, Reichardt LF. The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB. *J Neurosci.* 2000;20:6888-97.
- Yamashita K, Wiessner C, Lindholm D, Thoenen H, Hossmann KA. Post-occlusion treatment with BDNF reduces infarct size in a model of permanent occlusion of the middle cerebral artery in rat. *Metab Brain Dis.* 1997;12:271-280.
- Yang JT, Chang CN, Lee TH, Hsu JC, Lin TN, Hsu YH, Hsieh Wu J. Effect of dexamethasone on the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 messenger ribonucleic acids after forebrain ischemia in the rat. *Crit Care Med.* 2002;30:913-8.
- Yang J, Siao CJ, Nagappan G, Marinic T, Jing D, McGrath K, Chen ZY, Mark W, Tessarollo L, Lee FS, Lu B, Hempstead BL. Neuronal release of proBDNF. *Nat Neurosci.* 2009;12:113-5.

- Yang L, Zhang Z, Sun D, Xu Z, Yuan Y, Zhang X, Li L. Low serum BDNF may indicate the development of PSD in patients with acute ischemic stroke. *Int J Geriatr Psychiatry*. 2011;26:495-502.
- Yavuzer G, Selles R, Sezer N, Sütbeyaz S, Bussmann JB, Köseoğlu F, Atay MB, Stam HJ. Mirror therapy improves hand function in subacute stroke: a randomized controlled trial. *Arch Phys Med Rehabil*. 2008;89:393-8.
- Yong M, Diener HC, Kaste M, Mau J. Characteristics of blood pressure profiles as predictors of long-term outcome after acute ischemic stroke. *Stroke*. 2005;36:2619-25.
- Yoshimoto Y, Lin Q, Collier TJ, Frim DM, Breakefield XO, Bohn MC. Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res*. 1995;691:25-36.
- Yu H, Zhang Z, Shi Y, Bai F, Xie C, Qian Y, Yuan Y, Deng L. Association study of the decreased serum BDNF concentrations in amnesic mild cognitive impairment and the Val66Met polymorphism in Chinese Han. *J Clin Psychiatry*. 2008;69:1104-11.
- Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J*. 1990;9:3545-50.
- Zafra F, Castrén E, Thoenen H, Lindholm D. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:10037-41.
- Zhao LR, Mattsson B, Johansson BB. Environmental influence on brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience*. 2000;97:177-84.
- Zhao LR, Risedal A, Wojcik A, Hejzlar J, Johansson BB, Kokaia Z. Enriched environment influences brain-derived neurotrophic factor levels in rat forebrain after focal stroke. *Neurosci Lett*. 2001;305:169-72.
- Zhou Z, Lu T, Xu G, Yue X, Zhu W, Ma M, Liu W, Zhu S, Liu X. Decreased serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is associated with post-stroke depression but not with BDNF gene Val66Met polymorphism. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49:185-9.
- Zhu JM, Zhao YY, Chen SD, Zhang WH, Lou L, Jin X. Functional Recovery after Transplantation of Neural Stem Cells Modified by Brain-derived Neurotrophic Factor in Rats with Cerebral Ischaemia. *J Int Med Res*. 2011;39:488-98.
- Ziegenhorn AA, Schulte-Herbrüggen O, Danker-Hopfe H, Malbranc M, Hartung HD, Anders D, Lang UE, Steinhagen-Thiessen E, Schaub RT, Hellweg R. Serum neurotrophins--a study on the time course and influencing factors in a large old age sample. *Neurobiol Aging*. 2007;28:1436-45.

Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM. The role of G196A polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor gene in the cause of Parkinson's disease: a meta-analysis J Hum Genet. 2005;50:560-6.

Zittel S, Weiller C, Liepert J. Citalopram improves dexterity in chronic stroke patients. Neurorehabil Neural Repair. 2008;22:311-4.

Zuccato C, Cattaneo E. Role of brain-derived neurotrophic factor in Huntington's disease. Prog Neurobiol. 2007;81:294-330.