



HAL
open science

Approches physiopathologiques des interactions entre accident vasculaire cérébral et démence vasculaire

Claire Delattre

► **To cite this version:**

Claire Delattre. Approches physiopathologiques des interactions entre accident vasculaire cérébral et démence vasculaire. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S013 . tel-00982049

HAL Id: tel-00982049

<https://theses.hal.science/tel-00982049>

Submitted on 23 Apr 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.

Université Lille – Nord de France
Faculté de Médecine

Année 2013

N° _____

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE – NORD DE FRANCE

Discipline : Neurosciences

Présentée par

Claire Delattre

**Approches physiopathologiques des interactions entre
accident vasculaire cérébral et démence vasculaire**

Directeur de Thèse : Michèle Bastide

Soutenue le 16 septembre 2013

JURY

Michel Plotkine

Rapporteur

Omar Touzani

Rapporteur

Vincent Berezowski

Examineur

Christiane Charriaut-Marlangue

Examineur

Florence Pasquier

Examineur

Michèle Bastide

Directeur de Thèse

A mamie Berthe †,

A ma famille,

A mes amis,

Je remercie le Professeur Régis Bordet pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour m'avoir fait confiance en me laissant mener ce projet et pour le financement de ma dernière année.

Je remercie le Docteur Michèle Bastide pour m'avoir accompagné tout au long de mes années passées au laboratoire. Merci pour ton encadrement, ta disponibilité, ton aide et ta patience. Certains de mes (nombreux) problèmes n'auraient pas été résolus sans toi. Sois assurée de ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

Je remercie le Professeur Michel Plotkine de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de mon travail et d'avoir également permis son avancement en faisant partie de mon comité de suivi de thèse. Soyez assuré de toute ma gratitude et de mon estime.

Je remercie le Professeur Omar Touzani d'avoir accepté de juger mon travail en acceptant d'être rapporteur. Merci d'accomplir cette lourde tâche.

Je remercie le Professeur Vincent Berezowski d'avoir accepté d'examiner ce travail. Merci d'avoir siégé au sein de mon comité de suivi de thèse et pour les critiques toujours constructives qui m'ont permise de prendre le recul nécessaire et bénéfique à ce travail.

Je remercie également le Directeur de Recherche Christiane Charriaut-Marlangue et le Professeur Florence Pasquier d'avoir accepté de siéger dans mon jury pour examiner ce travail.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du laboratoire de Pharmacologie, pour leur accueil, leur sympathie et pour les bons moments passés ensemble.

A « ma famille de thèse », Kévin, « mon Parrain », Julie « ma Marraine » et Florent « mon Filleul » Quelle famille ! Un merci tout particulier pour le partage en tout genre (cadeaux, conseils ou autres). Par contre, en 4 ans, je n'aurai pas réussi à leur apprendre l'organisation, ça doit sauter une génération...

Un grand merci à Maud, Cédric, Thavarak, Charlotte, Mc Geek, JC pour m'avoir chacun apporté leur savoir-faire, leurs conseils, leur aide et leur patience qui m'ont permis de mener à bien ce projet.

Merci également au p'tit Nico et à mon filleul pour avoir patiemment et inlassablement effectuer les examens IRM de « Rémi » et tous les autres rats de labo nécessaires à ce projet.

Sans oublier les autres personnes que j'ai croisé durant toutes ces années, Laëtitia, Fabrice, Malika, Camille, Aude.

Merci à mes parents de me supporter, et à mon frère, qui m'a au moins permis de rester en forme durant ma thèse...

Un grand merci à mes amis, Puf, mini-Puf, Bultex, les indochinois, les Céline(s), Solweig, et les pièces rapportées ! 10 ans après le bac, voilà une nouvelle page de notre histoire, bon c'est pas un mariage ou un bébé mais au moins ça change un peu. Sans oublier Raimye Caillou, « Maman V. et Tata E. », ainsi que les 3 mousquetaires du club de tir de Douai, Greg, Dominique et Nicolas qui me changent les idées quand j'en ai besoin.

Je remercie également la « Protec » pour m'avoir permis même fortuitement de prendre conscience de l'utilité de ce travail.

Je remercie la Région Nord-Pas-de-Calais et le Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille pour m'avoir octroyé une allocation de recherche pendant une partie de mon travail de thèse.

Données bibliographiques	- 1 -
I. Définition.....	- 2 -
II. Epidémiologie	- 2 -
III. Etiologie	- 2 -
IV. Facteurs de risque	- 3 -
IV.1. Non modifiables.....	- 3 -
IV.2. Modifiables	- 4 -
IV.3. Potentiellement modifiables.....	- 5 -
V. Traitement.....	- 5 -
VI. Bilan biologique et surveillance	- 6 -
VII. Chronologie de l'AVC.....	- 6 -
VIII. Conséquences au sein de l'unité neuroglieuse	- 7 -
VIII.1. Défaillance énergétique au niveau cellulaire	- 8 -
VIII.2. Excitotoxicité	- 9 -
VIII.3. Stress oxydant et nitrant.....	- 10 -
VIII.4. Dysfonction de la Barrière Hémato Encéphalique.....	- 11 -
VIII.5. Découplage débit sanguin cérébral et métabolisme.....	- 12 -
VIII.6. Activation hémostatique.....	- 13 -
VIII.7. Inflammation	- 13 -
VIII.8. Apoptose	- 14 -
IX. Conséquences fonctionnelles d'un AVC.....	- 15 -
IX.1. Capacités motrices	- 16 -
IX.1.1. Tests d'évaluation	- 16 -
IX.1.2. Sévérité du déficit fonctionnel	- 19 -
IX.2. Capacités mnésiques	- 20 -
IX.2.1. Tests d'évaluation	- 20 -
IX.2.2. Sévérité du déficit mnésique	- 22 -
IX.3. Désordre émotionnel	- 23 -
X. Conséquences lésionnelles d'un AVC.....	- 24 -

X.1. Lésions tissulaires : imagerie.....	- 24 -
X.2. Lésions de la substance blanche.....	- 27 -
X.3. Boucle tri-synaptique.....	- 28 -
X.4. Atrophie hippocampique.....	- 30 -
X.5. Atrophies touchant d'autres régions.....	- 31 -
XI. Lésions cellulaires et moléculaires.....	- 31 -
XI.1. Degré de liberté de mouvements des molécules d'eau.....	- 32 -
XI.2. Modifications cellulaires au sein de l'hippocampe.....	- 32 -
XI.3. Cascade neurodégénérative.....	- 33 -
XI.4. Métabolisme.....	- 34 -
XII. Réparation et régénération.....	- 34 -
XIII. Modèles animaux.....	- 38 -
XIII.1. Modèle thrombo-embolique.....	- 38 -
XIII.2. Modèle photo-thrombotique.....	- 39 -
XIII.3. Modèle d'injection d'endothéline-1.....	- 40 -
XIII.4. Modèle de l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne.....	- 40 -
XIII.5. Modèles avec craniotomie.....	- 41 -
XIII.6. Modèles par les artères cérébrales postérieures.....	- 42 -
XIII.7. Modèle de thrombose veineuse.....	- 42 -
XIV. Etudes précliniques.....	- 42 -
XIV.1. Conséquences fonctionnelles.....	- 42 -
XIV.1.1. Déficit fonctionnel.....	- 43 -
XIV.1.2. Déficit cognitif.....	- 46 -
XIV.1.3. Désordre émotionnel.....	- 48 -
XIV.2. Conséquences lésionnelles.....	- 49 -
XIV.2.1. Evolution des lésions.....	- 49 -
XIV.2.2. Atrophie hippocampique.....	- 50 -
XIV.2.3. Atrophies dans d'autres régions.....	- 51 -
XV. Lésions cellulaires et moléculaires.....	- 51 -

XV.1. Lésion anatomiques	- 51 -
XV.2. Modifications cellulaires au sein de l'hippocampe	- 52 -
XV.3. Types cellulaires impliqués	- 52 -
XV.4. Cascade neurodégénérative	- 53 -
XV.5. Métabolisme.....	- 54 -
Présentation du travail.....	- 55 -
Matériels et méthodes	- 58 -
I. Animaux.....	- 59 -
II. Protocole.....	- 59 -
III. Modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne	- 59 -
IV. Imagerie par Résonance Magnétique	- 61 -
IV.1. Appareil	- 61 -
IV.2. Séquence préliminaire	- 61 -
IV.3. Séquence anatomique T2.....	- 62 -
IV.4. Séquence de diffusion	- 62 -
IV.5. Séquence de susceptibilité au fer	- 63 -
IV.6. Analyse de la séquence T2	- 63 -
V. Tests comportementaux.....	- 65 -
V.1. Test de l'actimétrie	- 65 -
V.1.1. Principe du test	- 65 -
V.1.2. Appareil et déroulement du test	- 65 -
V.1.3. Evaluation	- 66 -
V.2. Test de l'escalier	- 66 -
V.2.1. Principe du test	- 66 -
V.2.2. Appareil et déroulement du test	- 66 -
V.2.3. Evaluation	- 68 -
V.3. Test du cylindre	- 68 -
V.3.1. Principe du test	- 68 -
V.3.2. Appareil et déroulement du test	- 68 -

V.3.3. Evaluation	- 68 -
V.4. Test de la nage forcée	- 69 -
V.4.1. Principe du test	- 69 -
V.4.2. Appareil et déroulement du test	- 69 -
V.4.3. Evaluation	- 69 -
V.5. Test de l'alternance spontanée.....	- 70 -
V.5.1. Principe du test	- 70 -
V.5.2. Appareil et déroulement du test	- 70 -
V.5.3. Evaluation	- 70 -
V.6. Test de l'évitement passif	- 71 -
V.6.1. Principe du test	- 71 -
V.6.2. Appareil et déroulement du test	- 71 -
V.6.3. Evaluation	- 72 -
V.7. Test de la piscine de Morris.....	- 72 -
V.7.1. Principe du test	- 72 -
V.7.2. Appareil et déroulement du test	- 72 -
V.7.3. Evaluation	- 74 -
V.7.4. Test de vision.....	- 74 -
VI.Sacrifice des animaux	- 74 -
VI.1. Echantillons pour les coupes	- 74 -
VI.2. Mesure de la densité cellulaire	- 75 -
VI.2.1. Coloration Luxol Fast Blue/Crésyl Violet	- 75 -
VI.2.2. Comptage de la densité cellulaire	- 76 -
VI.2.3. Comptage de la surface cellulaire	- 76 -
VI.3. Echantillons pour les études moléculaires et biochimiques.....	- 76 -
VI.3.1. Extraction de l'ARN	- 76 -
VI.3.2. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)	- 77 -
VI.3.3. PCR en temps réel.....	- 77 -
VI.3.4. Extraction des protéines.....	- 79 -

VII. Analyse statistique.....	- 79 -
Résultats.....	- 80 -
I. Suivi des animaux.....	- 81 -
I.1. Evolution de la masse corporelle	- 81 -
I.2. Bilan des opérations	- 81 -
II. Suivi des lésions par IRM.....	- 82 -
II.1. Evolution de l'infarctus total	- 82 -
II.2. Evolution des autres types de lésions	- 84 -
II.3. Evolution des structures anatomiques.....	- 89 -
II.4. Evolution tissulaire dans les régions d'intérêt impliquées dans différentes fonctions comportementales.....	- 92 -
II.5. Evolution de la quantité de fer.....	- 94 -
III. Conséquences motrices de l'ischémie-reperfusion	- 96 -
III.1. Etude comportementale.....	- 96 -
III.1.1. Motricité générale.....	- 96 -
III.1.2. Utilisation asymétrique des pattes avant.....	- 97 -
III.1.3. Dextérité fine	- 98 -
III.1.4. Test de la nage forcée.....	- 99 -
III.2. Analyse de l'ADC par IRM	- 100 -
III.3. Corrélations entre le ratio d'ADC et le déficit de la patte avant controlatérale ...	-
101 -	
III.4. Etude de la densité cellulaire par coloration histologique	- 102 -
IV. Conséquences cognitives de l'ischémie-reperfusion	- 102 -
IV.1. Etude comportementale	- 102 -
IV.1.1. Mémoire à long terme	- 102 -
IV.1.2. Mémoire de travail	- 103 -
IV.1.3. Mémoire spatiale.....	- 104 -
IV.2. Analyse IRM.....	- 106 -
IV.2.1. Evolution des structures anatomiques.....	- 106 -
IV.2.2. Analyse de l'ADC par IRM.....	- 108 -

IV.3. Corrélation entre l'ADC et le déficit mnésique.....	- 111 -
IV.4. Etude histologique	- 111 -
IV.4.1. Densité cellulaire.....	- 111 -
IV.4.2. Surface cellulaire	- 113 -
IV.5. Taux d'expression de l'ARNm.....	- 115 -
Discussion.....	- 117 -
I. Résumé des résultats	- 118 -
II. Plasticité cérébrale et récupération fonctionnelle motrice	- 120 -
II.1. Remodelage tissulaire post-ischémique.....	- 120 -
II.2. Récupération fonctionnelle.....	- 121 -
III. Des perturbations mnésiques à la démence	- 127 -
III.1. L'ischémie-reperfusion cérébrale est responsable de déficits mnésiques	- 127 -
III.2. Atrophies hippocampique et corticale responsables de la démence ?.....	- 129 -
III.3. Mécanismes cellulaires et moléculaires	- 130 -
IV. Conclusion et Perspectives	- 134 -
Annexe	- 137 -
Références bibliographiques	- 138 -

Figure 1 : Schéma représentant les deux types d'AVC	- 2 -
Figure 2 : Exemples de territoires touchés dans des cas d'AVC.	- 3 -
Figure 3 : Représentation de la chronologie de l'AVC.	- 7 -
Figure 4 : Expansion du cœur ischémique au cours du temps.....	- 7 -
Figure 5 : Cinétique d'apparition des mécanismes physiopathologiques lors des premières phases d'une ischémie cérébrale.....	- 8 -
Figure 6 : Phénomènes précoces de la défaillance énergétique au niveau neuronal	- 9 -
Figure 7 : Activation des voies au niveau neuronal et glial menant au phénomène délétère d'excitotoxicité	- 10 -
Figure 8 : Implication des radicaux libres de l'oxygène dans l'apparition du stress oxydant et nitrant.....	- 11 -
Figure 9 : Phénomènes précoces de la rupture de la barrière hémato-encéphalique lors d'une ischémie mimée par OGD	- 12 -
Figure 10 : Cascade inflammatoire induite par une ischémie cérébrale	- 13 -
Figure 11 : Activation des voies apoptotiques lors d'une ischémie-reperfusion ..	- 15 -
Figure 12 : Evaluation de la sévérité par l'échelle NIHSS	- 17 -
Figure 13 : Evaluation du handicap par le score de Rankin	- 18 -
Figure 14 : Evaluation de la sévérité par l'index de Barthel.....	- 19 -
Figure 15 : Evaluation cognitive par le test du MMSE	- 21 -
Figure 16 : Incidence de la démence survenant après un AVC en fonction du temps basée sur des études faites en milieu hospitalier ou en communauté.	- 23 -
Figure 17 : Imagerie obtenue chez un patient suspecté de faire un AVC.	- 24 -
Figure 18 : Carte permettant l'évaluation du score ASPECTS	- 25 -
Figure 19 : Proportion selon le score de Rankin et le taux de décès chez des patients trois mois après la survenue de l'AVC en fonction de leur score ASPECTS à l'admission	- 25 -
Figure 20 : Imagerie d'un patient de 71 ans présentant soudainement un hémisyndrome moteur droit de la face et des membres associé à une aphasie	- 26 -
Figure 21 : Place de l'hippocampe au sein du cerveau	- 28 -
Figure 22 : Organisation de l'hippocampe.....	- 29 -
Figure 23 : Imagerie T1 de la zone de l'hippocampe chez un patient ayant subi un AVC touchant l'artère sylvienne.....	- 30 -
Figure 24 : Schéma du clivage de l'APP	- 33 -
Figure 25 : Schéma de la cinétique des mécanismes spontanés s'opérant après un AVC.....	- 36 -

Figure 26 : Cinétique d'activation des gènes impliqués dans les processus de croissance suite à un AVC	- 37 -
Figure 27 : Anatomies comparées de la vascularisation cérébrale chez le rat et chez l'Homme.....	- 38 -
Figure 28 : Modèle thrombo-embolique	- 39 -
Figure 29 : Modèle photo-thrombotique	- 39 -
Figure 30 : Modèle d'injection d'endothéline-1	- 40 -
Figure 31 : Modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne.....	- 41 -
Figure 32 : Modèle de thrombose veineuse	- 42 -
Figure 33 : Schéma du rotarod	- 44 -
Figure 34 : Test de retrait de l'adhésif.....	- 45 -
Figure 35 : Schéma du T-maze.....	- 46 -
Figure 36 : Schéma du test du labyrinthe en radial	- 47 -
Figure 37 : Photo du labyrinthe de Barnes.....	- 47 -
Figure 38 : Schéma du test de la reconnaissance d'objet	- 48 -
Figure 39 : Schéma du labyrinthe surélevé.....	- 49 -
Figure 40 : Imagerie T2 de rats ayant subi une ischémie transitoire par l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne	- 51 -
Figure 41 : Schéma représentant le protocole de l'étude	- 59 -
Figure 42 : Schéma représentant le modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne droite.....	- 60 -
Figure 43 : Photo d'un rat placé dans le berceau de l'IRM avec l'antenne de surface cérébrale avant d'être placé au cœur de la machine	- 61 -
Figure 44 : Segmentation grâce au logiciel ITK-Snap 1.8 sur une coupe coronale anatomique T2 de rat	- 64 -
Figure 45 : Image IRM en séquence anatomique T2 d'un rat à 24 heures de reperfusion	- 65 -
Figure 46 : Schéma du protocole d'étude des tests comportementaux	- 65 -
Figure 47 : Photo d'un rat dans l'actimètre	- 66 -
Figure 48 : Photo d'un rat dans le test de l'escalier	- 67 -
Figure 49 : Photo d'un rat durant le test du cylindre	- 68 -
Figure 50 : Photos d'un rat durant le test de la nage forcée	- 69 -
Figure 51 : Photo d'un rat dans le labyrinthe en Y lors du test de l'alternance spontanée	- 70 -
Figure 52 : Photo d'un rat dans l'enceinte blanche de l'évitement passif.....	- 71 -
Figure 53 : Photo d'un rat pendant la phase d'apprentissage de la piscine de Morris..	- 73 -

Figure 54 : Schéma du principe de la PCR quantitative	- 78 -
Figure 55 : Evolution de la masse corporelle et tableau des effectifs des deux groupes de rats au cours du temps	- 81 -
Figure 56 : Diagramme représentant la répartition temporelle des rats décédés au cours de l'étude	- 82 -
Figure 57 : Volume de l'infarctus total et de l'œdème au cours de la première semaine de reperfusion	- 83 -
Figure 58 : Volume de l'infarctus total suivi par séquence anatomique T2 au cours de l'étude.....	- 83 -
Figure 59 : Corrélation positive entre le volume de la lésion totale à 24 heures et le volume de la lésion totale à 6 mois (A), Plan de coupe sagittale en séquence anatomique T2 d'un rat ischémié à 24 heures de reperfusion mettant en évidence la lésion totale (cercle rouge) (B), Plan de coupe sagittale en séquence anatomique T2 d'un rat ischémié à 6 mois de post-ischémie mettant en évidence la lésion totale (cercle rouge) (C)	- 84 -
Figure 60 : Evolution du volume de l'hypersignal au cours du temps	- 85 -
Figure 61 : (A) Plan de coupe sagittale en séquence anatomique T2 d'un rat ischémié à 6 mois de post-ischémie mettant en évidence la lésion totale, (B) Photo de cerveau d'un rat ischémié présentant une cavité porencéphalique, (C) Coupe de rat colorée au Crésyl violet/Luxol Fast Blue.	- 85 -
Figure 62 : Evolution du volume des cavités porencéphaliques au cours du temps	- 86 -
Figure 63 : Corrélation positive entre le volume de la lésion totale à 24 heures et le volume des cavités porencéphaliques à 6 mois.....	- 87 -
Figure 64 : Evolution du volume des cavités porencéphaliques au sein de la région touchée par l'hypersignal.....	- 87 -
Figure 65 : (A) Evolution de la cinétique du volume de l'hyposignal au cours du temps, (B) Plan de coupe sagittale en séquence anatomique T2 d'un rat ischémié à 6 mois de post-ischémie mettant en évidence la lésion en hyposignal.....	- 88 -
Figure 66 : Evolution du volume des cerveaux des deux groupes de rats au cours du temps	- 89 -
Figure 67 : Evolution du volume des hémisphères des deux groupes de rats au cours du temps.....	- 90 -
Figure 68 : Evolution du volume des ventricules des deux groupes de rats au cours du temps	- 91 -
Figure 69 : Evolution du volume du ventricule ipsilatéral des deux groupes de rats au cours du temps.....	- 92 -

Figure 70 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région du thalamus dans les deux groupes au cours du temps	- 93 -
Figure 71 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région du noyau caudé dans les deux groupes au cours du temps	- 93 -
Figure 72 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région du cortex pariétal dans les deux groupes au cours du temps	- 94 -
Figure 73 : Comparaison des séquences en IRM, avec la séquence anatomique T2 et la séquence SWI au sein des rats sham et ischémiés à plusieurs temps de post-ischémies	- 95 -
Figure 74 : Distance totale parcourue en 10 min par les deux groupes de rats dans le test de l'actimètre au cours du temps.....	- 96 -
Figure 75 : Pourcentage d'utilisation de la patte avant ipsilatérale dans les deux groupes de rats au cours du temps	- 98 -
Figure 76 : Pourcentage d'utilisation des pattes avant controlatérale et ipsilatérale dans la saisie des granulés de chocolat dans le test de l'escalier.....	- 99 -
Figure 77 : Temps de nage lors du test de la nage forcée chez les deux groupes de rats au cours du temps.....	- 100 -
Figure 78 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région du cortex de la patte avant dans les deux groupes au cours du temps.....	- 100 -
Figure 79 : Corrélations positive entre le ratio de l'ADC de la zone du cortex de la patte avant et le pourcentage d'utilisation de la patte droite lors du test de l'escalier à différents temps de post-ischémie	- 101 -
Figure 80 : Temps de latence pour retourner dans le compartiment sombre lors du test de l'évitement passif dans les deux groupes de rats au cours du temps	- 103 -
Figure 81 : Pourcentage d'alternances lors du test de l'alternance spontanée dans les deux groupes de rats au cours du temps	- 104 -
Figure 82 : Courbes d'apprentissage concernant le temps de latence pour atteindre la plate-forme lors du test de la piscine de Morris pour les deux groupes de rats à 6 mois de post-ischémie	- 104 -
Figure 83 : Pourcentage du temps passé lors du test dans chaque quadrant de la piscine de Morris. Le quadrant Nord-Est est le quadrant cible où se trouvait la plate-forme durant la phase d'apprentissage.....	- 105 -
Figure 84 : Temps de latence pour atteindre la plate-forme, et nombre de croisements de la zone de la plate-forme le jour du test par les deux groupes de rats. .	- 106 -
Figure 85 : Evolution du volume des hippocampes des deux groupes de rats au cours du temps.....	- 106 -

Figure 86 : Evolution de l'épaisseur du cortex entorhinal des deux groupes de rats au cours du temps.....	- 107 -
Figure 87 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région du corps calleux dans les deux groupes au cours du temps.....	- 108 -
Figure 88 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région du cortex entorhinal dans les deux groupes au cours du temps.....	- 109 -
Figure 89 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région de l'hippocampe dans les deux groupes au cours du temps.....	- 110 -
Figure 90 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région de l'amygdale dans les deux groupes au cours du temps.....	- 110 -
Figure 91 : Corrélation négative entre le score lors du test de l'alternance spontanée et le ratio de l'ADC de la zone de l'hippocampe à 6 mois de post-ischémie.....	- 111 -
Figure 92 : Photos représentant une coupe au niveau de l'hippocampe ipsilatéral d'un rat sham et d'un rat ischémié à 2 mois de post-ischémie.....	- 113 -
Figure 93 : Evolution de la surface cellulaire de la zone CA1 de l'hippocampe ipsilatéral des deux groupes de rats au cours du temps.....	- 114 -
Figure 94 : Evolution de la surface cellulaire de la zone CA2 de l'hippocampe ipsilatéral des deux groupes de rats au cours du temps.....	- 114 -
Figure 95 : Evolution de la surface cellulaire de toutes les zones étudiées dans la région de l'hippocampe ipsilatéral dans les deux groupes de rats à 6 mois de post-ischémie.....	- 115 -
Figure 96 : Taux d'expression de l'ARNm du BDNF au sein des cortex.....	- 116 -
Figure 97 : Taux d'expression de l'ARNm du BDNF au sein des hippocampes.....	- 116 -

Tableau 1 : Détail des zones segmentées à partir des données DICOM en fonction du temps post-ischémique.....	- 63 -
Tableau 2 : Présentation des départs successifs durant le test de la piscine de Morris	- 73 -
Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour étudier les gènes cibles	- 79 -
Tableau 4 : Pourcentage de rats développant des cavités porencéphaliques	- 86 -
Tableau 5 : Pourcentage de rats développant un hyposignal.....	- 89 -
Tableau 6 : Score d'intensité de la présence de Fer au sein des cerveaux.....	- 95 -
Tableau 7 : Temps d'inactivité et vitesse maximum des groupes de rats lors du test de l'actimétrie	- 97 -
Tableau 8 : Nombre de granulés attrapés par les deux pattes et mangés lors de l'apprentissage du test de l'escalier	- 98 -
Tableau 9 : Résultats de la densité cellulaire dans la zone du cortex contrôlant la patte avant.	- 102 -
Tableau 10 : temps d'acquisition lors de la première journée du test de l'évitement passif.....	- 103 -
Tableau 11 : Résultats de la densité cellulaire dans différentes zones impliquées dans les processus mnésiques.....	- 112 -

Abréviations

A

A β : Amyloid-beta

ACM : Artère Cérébrale Moyenne

ADC : Apparent Diffusion Coefficient

ADN : Acide DésoxyRiboNucléique

ADNc : Acide DésoxyRibonucléique complémentaire

ADP : Adénosine Di-Phosphate

AIT : Accident Ischémique Transitoire

AMPA : alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

APAF-1 : Apoptotic Protease Activating Factor 1

APP : Amyloid Precursor Protein

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

ASPECTS : Alberta Stroke Program Early CT Score

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

B

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

C

CA : Corne d'Ammon

CAP-23 : Cytoskeleton-Associated Protein-23

Caspase : Cysteine-aspartic proteases

D

DG : Gyrus Denté

DICOM : Digital Imaging and Communications in Medicine

DSC : Débit Sanguin Cérébral

DWI : Diffusion Weighted Imaging

E

ECV : Entorhinal Cortex Layer V

F

FLASH : Fast Low Angle SHot

G

GAP-43 :Growth-Associated Protein 43

GFAP : Glial Fibrillary Acid Protein

H

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HDL : High Density Lipoprotein

I

Il-1 β : Interleukine 1-beta

I/R : Ischémie/Reperfusé

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

L

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LDL : Low Density Lipoprotein

M

MCAO : Middle Cerebral Artery Occlusion

MCI : Mild Cognitive Impairment

MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1

MMP : MétalloProtéinases

MMSE : Mini Mental State Examination

mPTP : pore de transition mitochondrial de perméabilité membranaire

mRS : modified Rankin Scale

N

NIHSS : National Institute of Health Stroke Scale

NINDS : National Institute of Neurological Disorders and Stroke

NMDA : N-methyl-D-aspartate

NO : Oxide Nitrique

NOS : Nitric Oxide Synthase

O

O_2^- : ion superoxide

OGD : Oxygen Glucose Deprivation

OH^\bullet : radical hydroxyle

$ONOO^-$: peroxynitrite

P

PFA : Paraformaldéhyde

Q

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

R

ROI : Region Of Interest

Rt-PA : Recombinant tissue Plasminogen Activator

RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

S

SCG 10 : Superior Cervical Ganglion-10

SCLIP : SCG-10 Like Protein

SWI : Susceptibility Weighted Imaging

T

TBP : TATA Binding Protein

TE : Temps d'Echo

TEP : Tomographie à Emissions de Positrons

TNF- α : Tumor Necrosis Factor alpha

TOAST : Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

TR : Temps de Répétition

TurboRARE : Turbo Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement

Données bibliographiques

I. Définition

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont caractérisés par une diminution du flux sanguin au niveau cérébral, entraînant une diminution de l'apport d'oxygène et de métabolites au sein du tissu cérébral. Il s'ensuit dans un court délai une souffrance cellulaire, pouvant entraîner la mort neuronale si le débit sanguin n'est pas rétabli rapidement. Il existe deux types d'AVC, le type hémorragique retrouvé dans environ 20 % des cas et l'AVC ischémique présent dans la majorité des cas avec une prévalence d'environ 80 % (figure 1).

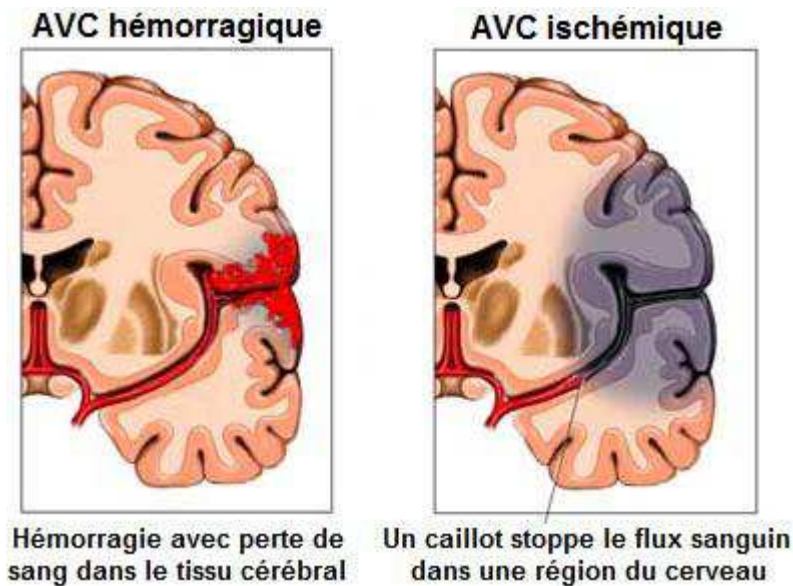


Figure 1 : Schéma représentant les deux types d'AVC : hémorragique (à gauche) et ischémique (à droite).

II. Epidémiologie

Les AVC représentent un problème majeur de Santé Publique et sont la 1^{ère} cause de handicap, la 2^{ème} cause de démence et la 3^{ème} cause de décès dans les pays industrialisés. Les séquelles peuvent être importantes et nécessiter la prise en charge du patient dans des structures hospitalières adaptées entraînant un fort impact économique selon la sévérité de l'AVC (Spieler *et al*, 2004).

III. Etiologie

Plusieurs causes peuvent en être à l'origine, l'étude TOAST « Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment » menée en 1993 a permis de distinguer les différentes étiologies de l'AVC (Adams *et al*, 1993) (figure 2) :

- Athérosclérose d'un gros tronc artériel (Embolie/Thrombose) : suite à la formation de plaques athéromateuses dans les artères, le diamètre de celles-ci est diminué. De plus, de petits fragments peuvent se détacher et aller obstruer des artères situées en aval de cette plaque.

- Cardio-embolie : elle résulte de la formation de petits thrombus au niveau du cœur favorisée lors de troubles du rythme cardiaque, qui vont migrer vers les artères cérébrales à la faveur de la circulation sanguine.
- Occlusion de vaisseaux de petit calibre (lacunes) : ce sont de petits infarctus dont le diamètre lésionnel va être inférieur à 15 mm et qui sont essentiellement dus à l'occlusion de petites artéριοles perforantes.
- Dissection artérielle : elle concerne principalement les artères carotidiennes et résulte de la dissection de la paroi du vaisseau provoquant ainsi une cavité infiltrée par du sang et rétrécissant la lumière de l'artère.

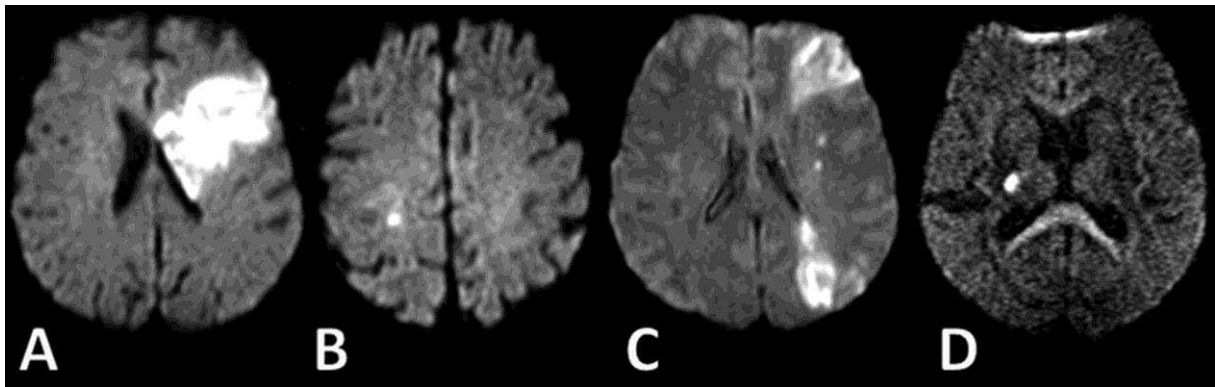


Figure 2 : Exemples de territoires touchés dans des cas d'AVC : (A) infarctus sylvien (B) embolique (C) périphérique et (D) lacunaire (Förster *et al*, 2009).

IV. Facteurs de risque

De nombreux facteurs de risque prédisposent à la survenue d'un AVC. Ils peuvent être classés en trois catégories, les facteurs dits « non modifiables », les facteurs dits « modifiables » qui peuvent être corrigés afin de diminuer le risque de survenue des AVC et qui sont aujourd'hui bien documentés et donc mieux maîtrisés. Enfin, certains facteurs sont aujourd'hui « potentiellement modifiables » mais les études actuelles ne sont pas encore suffisantes pour confirmer ou infirmer un effet protecteur.

IV.1. Non modifiables

Les groupes d'origine latine ou afro-américaine ont une prévalence augmentée quant à la survenue d'un AVC (Tuhim *et al*, 1997).

L'âge est un facteur aggravant puisque le risque double à chaque décennie à partir de 55 ans (Wolf *et al*, 1992). Jusqu'à l'âge de 85 ans, les hommes sont plus susceptibles à la survenue d'un AVC (Brown *et al*, 1996).

Une étude menée en Grande-Bretagne a démontré la relation entre un faible poids de naissance (< 2500 g) et le risque de mortalité élevée au décours d'un AVC à l'âge adulte (Barker & Lackland, 2003).

Les antécédents familiaux d'AVC ou d'AIT « Accident Ischémique Transitoire » prédisposent à la survenue du même type d'épisode chez la descendance (Kiely *et al*, 1993). Ceci s'explique par plusieurs facteurs, tels que l'hérédité avec la transmission des facteurs de risque, le même environnement culturel ou encore le même style de vie.

IV.2. Modifiables

L'hypertension reste aujourd'hui le facteur de risque majeur de survenue d'un AVC. Plus la pression artérielle systémique est élevée, plus le risque de survenue d'un AVC est augmenté (Lewington *et al*, 2002). L'hypertension favorise également le risque de transformation hémorragique. Cependant, la prise de traitements antihypertenseurs permet de diminuer significativement (de 35 à 44 %) le risque de survenue d'un AVC (Neal *et al*, 2000).

Les études montrent une prévalence élevée de survenue d'accident ischémique lorsque le taux de cholestérol total est élevé (valeurs au-dessus de 6,20 mmol.L⁻¹) (Iso *et al*, 1989). Chaque incrémentation de 1 mmol.L⁻¹ de ce taux augmente de 25 % l'incidence de survenue d'un AVC (Horenstein *et al*, 2002 ; Zhang *et al*, 2003). Concernant l'incidence du taux de LDL « Low Density Lipoprotein », les études menées à l'heure actuelle manquent de puissance pour mettre en évidence un quelconque effet. En ce qui concerne les taux de HDL « High Density Lipoprotein », les résultats des études sont plus contrastés. Pour des taux élevés, le risque d'événements ischémiques est diminué de 47 % pour chaque élévation de 1 mmol.L⁻¹ du taux de HDL dans le sang et ce chez les deux sexes (Lindenstrom *et al*, 1994). A l'inverse, un taux bas est corrélé à un risque élevé de survenue des AVC en particulier chez les femmes (Soyama *et al*, 2003).

Le diabète est aujourd'hui un facteur de prévalence primordial et l'étude menée sur la cohorte de Honolulu a démontré un risque deux fois plus important d'AVC thrombo-embolique chez les sujets diabétiques comparés à des sujets non diabétiques (Burchfiel *et al*, 1994).

Par ailleurs, d'autres facteurs de risque sont aujourd'hui connus pour augmenter le risque de survenue d'accident ischémique. Parmi ces autres facteurs corrigibles, on peut citer la consommation de tabac, les problèmes cardio-vasculaires (fibrillation auriculaire, sténose carotidienne...), la drépanocytose, l'hormonothérapie substitutive, le régime alimentaire (un régime riche en fruits et légumes aura un effet bénéfique tandis qu'une

consommation élevée de sodium aura un effet délétère en lien avec la pression artérielle). De même l'inactivité physique, un indice de masse corporelle élevée et une mauvaise distribution de la graisse augmenteront l'incidence de survenue des AVC (Goldstein *et al*, 2006).

IV.3. Potentiellement modifiables

Ce sont de nouveaux facteurs pris en compte dans la prévention des AVC. Cependant, ils sont encore insuffisamment maîtrisés, soit par manque de puissance des études cliniques soit par difficulté à étudier ce type de facteur de risque. Parmi ceux-ci, le syndrome métabolique défini par la présence d'au moins trois facteurs de risque comme l'hypertension artérielle, le diabète, ou encore la dyslipidémie (Gupta & Gupta, 2010). De même des taux élevés d'homocystéine, de lipoprotéine A ainsi que de lipoprotéine associée Phospholipase A2, protéines impliquées dans les phénomènes d'athérosclérose pour la première et du métabolisme des LDL pour les secondes seraient associées à un risque accru d'AVC. Par ailleurs, l'hypercoagulabilité, l'inflammation chronique se traduisant par un taux élevé de Protéine C Réactive ainsi que les infections augmentent la susceptibilité à l'AVC. Actuellement, des facteurs tels que l'apnée du sommeil, les migraines, la contraception orale ou encore l'abus d'alcool ou de drogue sont soupçonnés de favoriser la survenue d'AVC (Goldstein *et al*, 2006).

V. Traitement

Durant de nombreuses années, les recherches concernant un traitement des AVC ischémiques se sont heurtées à la fréquence élevée de complications hémorragiques survenant chez ces patients. Au début des années 90, deux essais cliniques ont permis de démontrer la pertinence de l'utilisation du Rt-PA « Recombinant tissue Plasminogen Activator ou alteplase » dans le but de réaliser une thrombolyse du caillot. Cette étude menée par le National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) en 1995 a démontré que 3 mois après la survenue de l'AVC, la récupération fonctionnelle des patients thrombolysés est 30 % meilleure comparée au groupe placebo. En revanche, le risque de transformation hémorragique est plus élevé dans le cadre de l'utilisation de Rt-PA (6,4 % des patients) comparé au groupe placebo (0,6 %). Cependant, malgré cet aspect délétère, la mortalité à 3 mois ne diffère pas selon les groupes (17 % dans le groupe Rt-PA versus 21 % pour le groupe placebo).

Jusqu'en 2008, son action thérapeutique se situait dans une fenêtre ne pouvant dépasser 3 heures depuis l'apparition des symptômes. Cependant, compte tenu des contraintes inhérentes à la prise en charge des patients, à la durée d'établissement d'un diagnostic et des effets secondaires chez les personnes présentant des facteurs aggravants

de risque hémorragique, de nombreux patients ne pouvaient bénéficier de ce traitement. Afin de pallier à cette étroite fenêtre de traitement, une étude datant de 2008 a permis d'allonger la durée d'utilisation de l'Actilyse® (de 3 heures à 4,5 heures suivant l'apparition des symptômes) permettant une meilleure récupération fonctionnelle à 3 mois en comparaison au groupe placebo. Cependant, le taux de transformation hémorragique reste inchangé et est plus élevé chez les patients thrombolysés. Toutefois, cela n'a pas d'incidence sur le taux de mortalité des patients traités ou non 3 mois après la survenue du premier événement (Hacke *et al*, 2008).

VI. Bilan biologique et surveillance

Lors de la prise en charge en phase hyperaigüe, les antécédents du patient sont examinés afin d'évaluer le diagnostic et le pronostic d'AVC. Sont notamment recherchés parmi les facteurs de risque les plus répandus, la présence d'une hypercholestérolémie, d'hypertension artérielle, de diabète. Un électrocardiogramme, ainsi que des prélèvements sanguins sont effectués tels qu'une numération de la formule sanguine et une glycémie capillaire. Pendant son séjour au sein de l'unité neurovasculaire, les paramètres vitaux du patient sont régulièrement contrôlés afin de prévenir toute détresse. Dans cette optique, la pression artérielle, la saturation en oxygène, la température corporelle, et le rythme cardiaque sont contrôlés en permanence afin de prévenir tout facteur aggravant le pronostic.

VII. Chronologie de l'AVC

L'AVC peut être décomposé en plusieurs phases qui vont se succéder dans le temps. Les conséquences d'une ischémie commencent dès les premières secondes suivant l'occlusion et vont perdurer des semaines voir des mois après sa survenue. Conformément aux observations effectuées chez les patients et aux mécanismes connus, la chronologie de l'AVC peut être définie en cinq phases (figure 3) (Kreisel *et al*, 2006). La phase hyperaigüe débute dès l'ischémie et dure 6 heures, où les premiers mécanismes se mettent en place. Une phase aigüe démarre ensuite jusqu'à 4 jours et correspond au déclenchement des mécanismes secondaires à l'ischémie. Elle est suivie par une phase subaigüe qui démarre 48 heures après l'ischémie et perdure jusqu'à 2 – 3 semaines après cet événement et comprend à la fois les mécanismes secondaires et les premiers mécanismes de plasticité. A partir de 3 semaines, débute une phase de consolidation jusqu'au début du déclin des fonctions neuronales, quelques mois après la survenue de l'AVC. Enfin, la dernière phase correspondant à la phase chronique commence aux environs du 3^{ème} mois suivant l'épisode ischémique et chevauche la période de consolidation où les phénomènes mis en place précédemment commencent à se stabiliser.

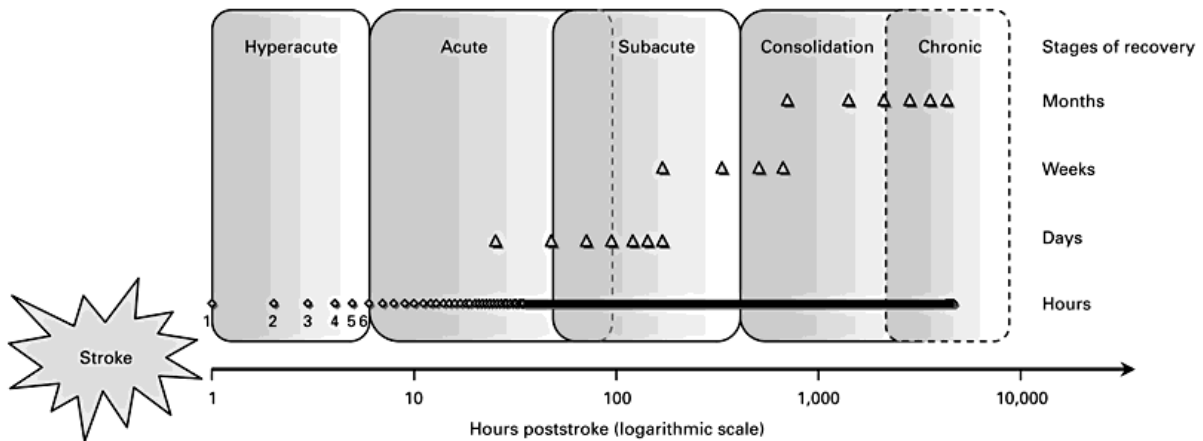


Figure 3 : Représentation de la chronologie de l'AVC (Kreisel *et al*, 2006).

Cette chronologie n'est pour autant ni définitive, ni figée car les phénomènes s'opérant au décours d'une ischémie-reperfusion sont particulièrement complexes et encore méconnus à ce jour.

VIII. Conséquences au sein de l'unité neurogliovasculaire

L'ischémie cérébrale résulte d'une diminution drastique et soudaine du flux sanguin, provoquant une diminution de l'apport en oxygène, en métabolites ou encore en ions au niveau du tissu cérébral.

Dès lors, deux zones vont se distinguer au sein de la région touchée par cette ischémie : une zone où le débit sanguin cérébral est extrêmement réduit, entraînant une dysfonction irréversible des cellules composant le tissu cérébral avec pour effet immédiat le déclenchement de processus nécrotiques menant à une mort cellulaire que l'on va appeler le cœur de l'ischémie.

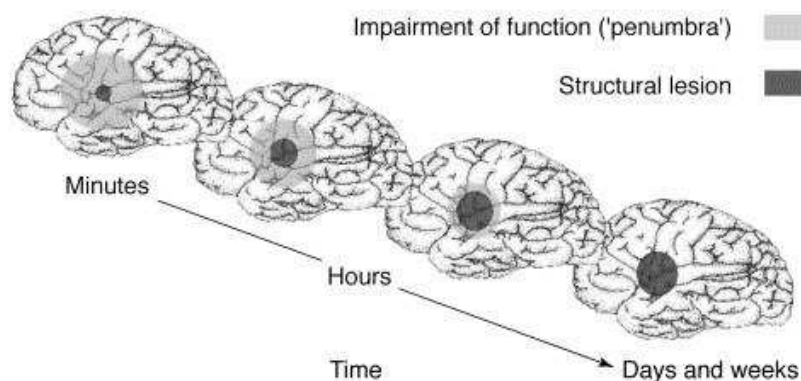


Figure 4 : Expansion du cœur ischémique au cours du temps (Dirnagl *et al*, 1999).

En périphérie de celui-ci, se trouve la zone dite de pénombre dans laquelle le débit sanguin cérébral est diminué mais néanmoins suffisant dans un premier temps pour

maintenir la perfusion des tissus. La présence concomitante d'artères collatérales au niveau de cette zone permet de maintenir l'intégrité structurale même si le tissu cérébral est dysfonctionnel. Au sein de cette zone, des processus apoptotiques se mettent en place progressivement durant la phase subaigüe. Si le débit sanguin n'est pas restauré rapidement (quelques heures), il s'ensuit une expansion du cœur de l'ischémie dans cette zone (figure 4).

La préservation de l'intégrité de cette zone de pénombre est essentielle. C'est pourquoi il est nécessaire de comprendre les événements physiopathologiques qui se succèdent en cascade suite à une ischémie cérébrale (figure 5).

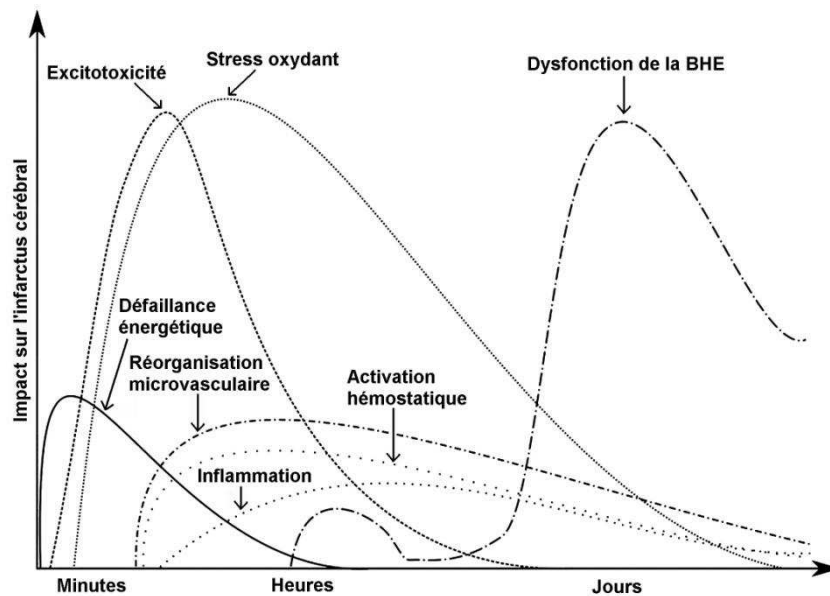


Figure 5 : Cinétique d'apparition des mécanismes physiopathologiques lors des premières phases (hyperaigüe, aigüe et subaigüe) d'une ischémie cérébrale (Brouns & De Deyn, 2009).

VIII.1. Défaillance énergétique au niveau cellulaire

Le cerveau consomme à lui seul 20 % de tout l'oxygène de l'organisme et ce quelque soit l'activité (Edvinsson & Krause, 2002). Par conséquent, immédiatement après le début de l'ischémie, les phénomènes de phosphorylation oxydative sont stoppés, empêchant la production d'ATP nécessaire au fonctionnement de la pompe Na^+/K^+ ATPase. La redistribution des ions Na^+ et K^+ de part et d'autre de la membrane n'est alors plus effectuée. Le potentiel d'action, se propageant de proche en proche, entraîne une dépolarisation permanente des neurones et de la glie qui se propage rapidement au sein de la zone ischémisée (Martin *et al*, 1994). Suite à cela, au niveau pré-synaptique, les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants s'ouvrent massivement provoquant le mouvement et la fusion des vésicules synaptiques et la libération massive de neurotransmetteurs tels que le glutamate (figure 6). En parallèle de ces effets immédiats, la privation d'oxygène engendre la

production de lactate via le mécanisme de glycolyse anaérobie libérant des formes libres de l'oxygène exacerbant le phénomène (Brouns *et al*, 2008).

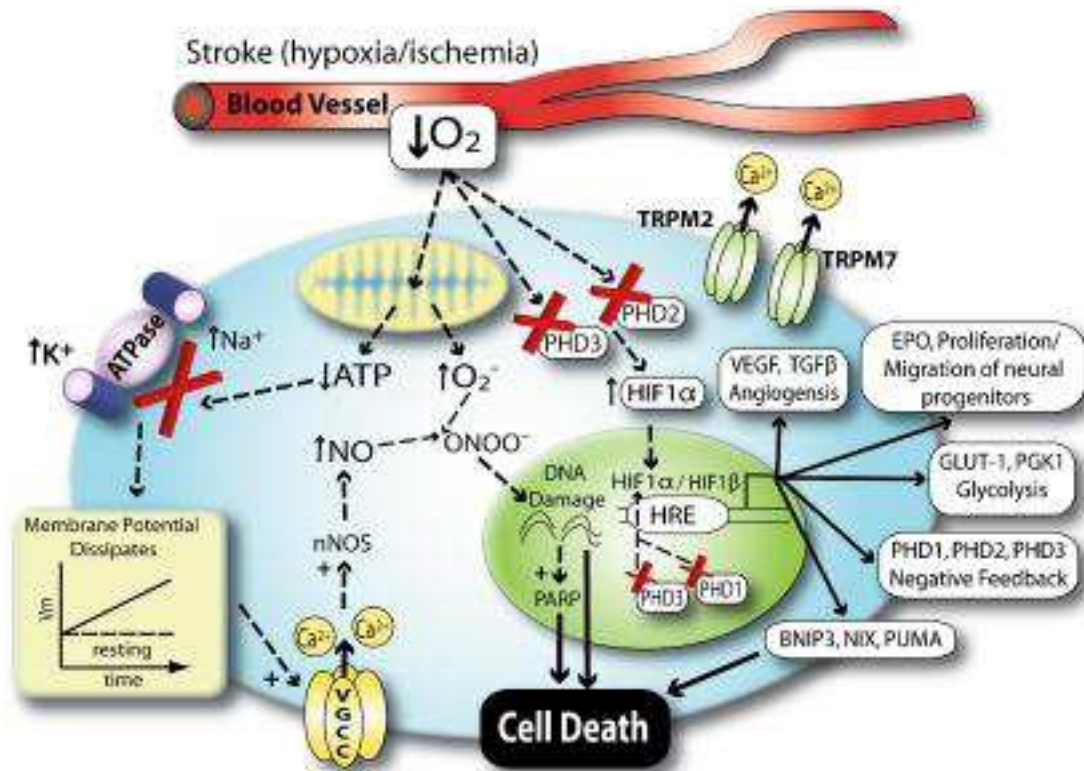


Figure 6 : Phénomènes précoces de la défaillance énergétique au niveau neuronal (Ratan *et al*, 2007)

VIII.2. Excitotoxicité

Suite au relargage massif de glutamate dans la fente synaptique, il y a une activation des récepteurs AMPA « alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid », NMDA « N-méthyl-D-aspartate » et kainate provoquant leur ouverture et un influx d'ions Ca^{2+} et Na^+ (figure 7). Une dépolarisation massive se produit par une suractivation du système (Dirnagl *et al*, 1999). De manière concomitante à cet influx, survient également un passage de molécules d'eau provoquant un œdème cytotoxique (Furukawa *et al*, 1997). L'augmentation des ions Ca^{2+} au niveau intracellulaire dans le tissu ischémié va favoriser la production de radicaux libres de l'oxygène via la formation de l'ion superoxyde. Cette excitotoxicité active certaines voies de signalisation provoquant l'activation de gènes pro-inflammatoires.

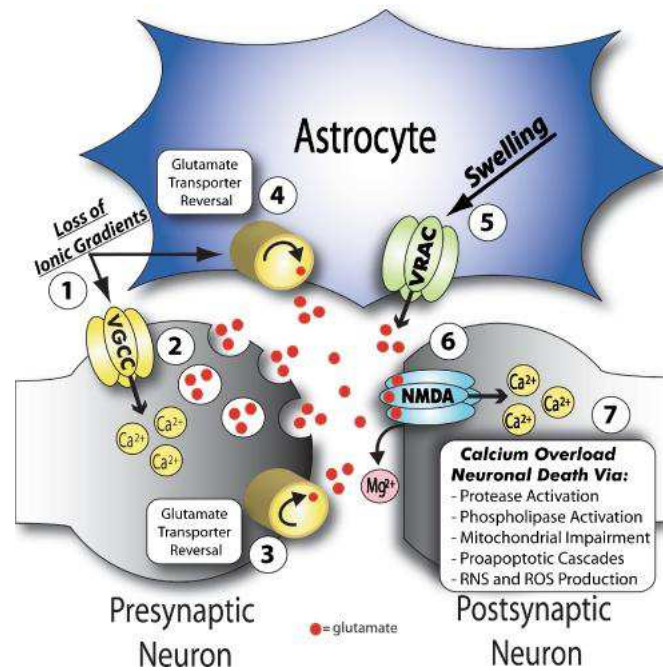


Figure 7 : Activation des voies au niveau neuronal et glial menant au phénomène délétère d'excitotoxicité (Ratan *et al*, 2007)

VIII.3. Stress oxydant et nitrant

Des concentrations élevées d'ions Ca^{2+} et Na^+ ainsi que d'ADP vont engendrer une production de radicaux libres de l'oxygène au niveau mitochondrial. Parmi les espèces réactives de l'oxygène produites, l'ion superoxide (O_2^-) peut former du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui peut à son tour former un radical hydroxyle (OH^\bullet) (Beckman & Koppenol, 1996).

Par ailleurs, l'ischémie entraîne une activation de la voie des Nitric Oxide Synthase (NOS) dont il existe trois types au sein du tissu cérébral. La NOS I se trouve au niveau du tissu neuronal, la NOS III se situe au sein de l'endothélium vasculaire. Ces enzymes sont constitutionnellement actives et Ca^{2+} -dépendantes. La NOS II est induite par des cytokines au niveau de la glie et des neutrophiles (Zhang *et al*, 1995). Lors de l'activation de ces enzymes par l'ischémie, il y a production d'oxyde nitrique (NO) qui va avoir plusieurs effets selon le type de cellules cibles. Les NOS I et II vont être délétères au niveau des neurones et de l'infiltration des neutrophiles car elles entraînent la production d'un peroxyde nitrique (ONOO^-) extrêmement toxique. En revanche, l'activation de la NOS III au niveau de l'endothélium vasculaire améliore le débit sanguin via un effet vasodilatateur, une inhibition de l'adhésion des plaquettes et de l'adhésion des leucocytes (figure 8).

Ces effets délétères impactent le phénomène de reperfusion et entraînent de multiples conséquences négatives au sein du tissu cérébral. Un recrutement et une migration des cellules pro-inflammatoires tels que les leucocytes ou les neutrophiles mènent

à un relargage d'enzymes qui vont dégrader la lame basale et augmenter la perméabilité vasculaire provoquant l'apparition d'un œdème vasogénique ou une hémorragie parenchymale (Crack & Taylor, 2005).

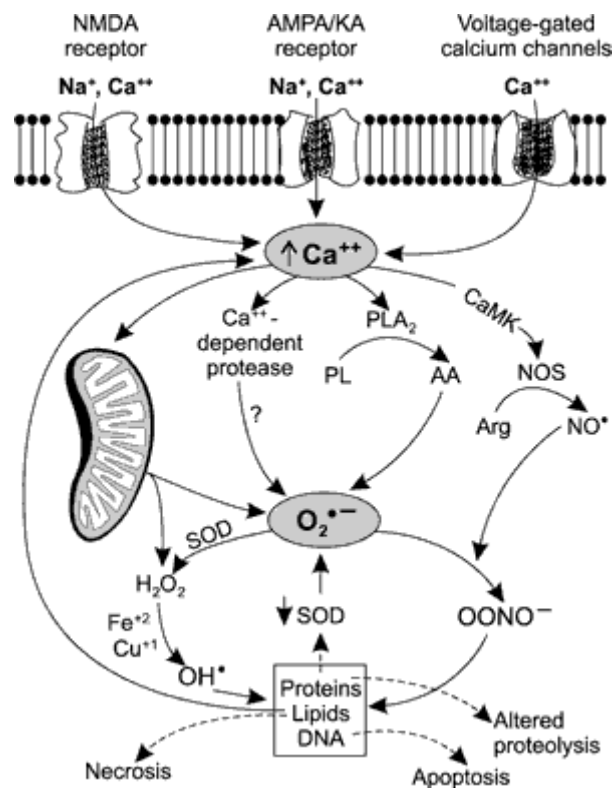


Figure 8 : Implication des radicaux libres de l'oxygène dans l'apparition du stress oxydant et nitrant.

VIII.4. Dysfonction de la Barrière Hémato Encéphalique

Les effets de l'ischémie sur la perméabilité de la BHE ont la particularité d'être biphasiques (Kuroiwa *et al*, 1985). Dans un premier temps, la production des radicaux libres de l'oxygène active les métalloprotéinases (MMP) dont le rôle va être de dégrader le collagène et la laminine contenus dans la lame basale provoquant une augmentation de la perméabilité de la BHE dans les 2 heures suivant le début de l'ischémie (Hamann *et al*; 1995 ; Belayev *et al*, 1996). Les modèles *in vitro* de BHE montrent une augmentation du passage transcellulaire via des phénomènes de pinocytose (Brillault *et al*, 2002 ; Cipolla *et al*, 2004) (figure 9). De plus, lors de l'ischémie, les pompes Na^+/K^+ ATPase au niveau de cette barrière sont activées, exacerbant l'œdème cytotoxique (Brillault *et al*, 2008).

Dans un deuxième temps, entre 24 heures et 72 heures (Kastrup *et al*, 1999), il y a une infiltration leucocytaire et une libération de MMP-9 qui rompent la BHE (Gidday *et al*, 2005).

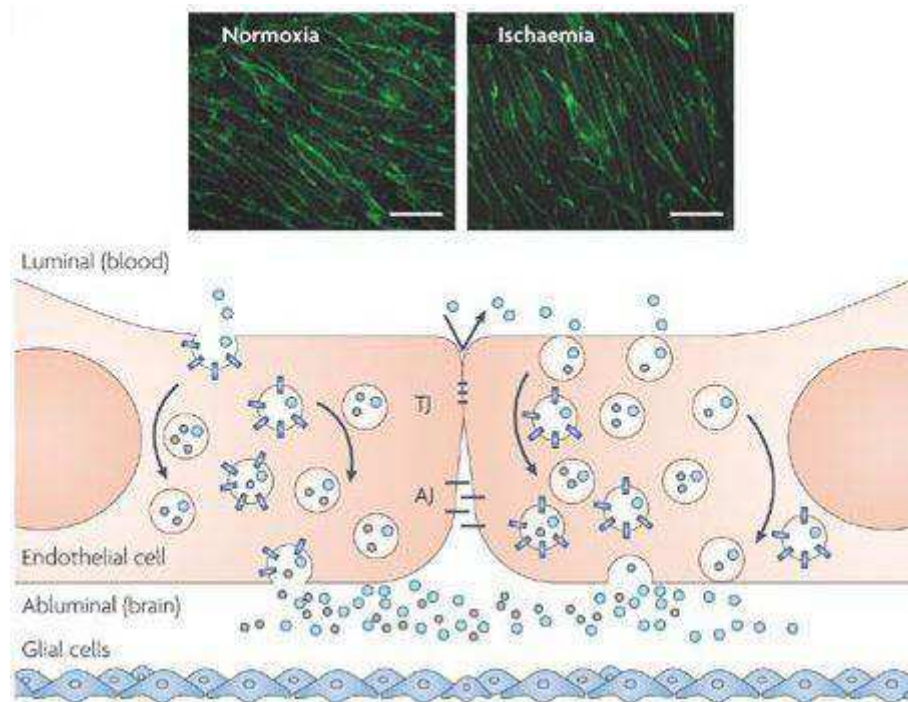


Figure 9 : Phénomènes précoces de la rupture de la barrière hémato-encéphalique lors d'une ischémie mimée par OGD « Oxygen Glucose Deprivation ». Les jonctions serrées marquées par l'occludine ne sont pas rompues (Cecchelli *et al*, 2007).

VIII.5. Découplage débit sanguin cérébral et métabolisme

Le cerveau est très dépendant des apports sanguins pour son fonctionnement. L'augmentation de l'activité neuronale est couplée à l'augmentation du flux sanguin cérébral. En dehors de toute condition ischémique, la perfusion cérébrale est maintenue constante quelque soit la pression artérielle grâce à des mécanismes d'autorégulation des vaisseaux cérébraux qui impliquent des phénomènes de contraction et de vasodilatation. Ceux-ci limitent les dommages au sein du tissu cérébral lors de changements brusques de pression. Lors d'une ischémie et plus particulièrement, lors des phénomènes de reperfusion, cette autorégulation est altérée. Le tonus myogénique qui permet au vaisseau, par une réponse contractile de lutter contre les hausses de pression artérielle est inefficace. Au niveau du muscle lisse vasculaire, l'activité de différents types de canaux potassiques, rectifiants entrants (Kir2.x) ou voltage-dépendants (Kv) est perturbée avec pour conséquence une diminution de la relaxation du muscle lisse (Pétrault *et al*, 2004 ; Plaisier *et al*, 2008a et b). En parallèle à ces effets, la relaxation endothéliale induite par l'acétylcholine est également diminuée. A la phase aigüe de l'ischémie, la réponse des vaisseaux au NO est donc fortement altérée perturbant la reperfusion des zones cérébrales en particulier au niveau de la pénombre (Bastide *et al*, 2003).

VIII.6. Activation hémostatique

L'ischémie cérébrale entraîne une activation plaquettaire et de manière concomitante, les cellules endothéliales lésées, exposées au sang, vont activer la cascade de coagulation. Au niveau des micro-vaisseaux, cela provoque une absence de reperfusion de manière très localisée par des interactions entre les plaquettes activées et les facteurs de coagulation provoquant la formation de petits thrombus au sein de la zone ischémique (Brouns & De Deyn, 2009).

VIII.7. Inflammation

La cascade inflammatoire va s'effectuer en plusieurs temps. Lors de la phase hyperaigüe, la microglie présente naturellement dans le cerveau va s'activer quelques minutes après l'ischémie et déclencher la production de médiateurs pro-inflammatoires, tels que des cytokines et des chimiokines exacerbant les dommages tissulaires. Le taux d'ARN d'IL-1 β « interleukine-1 beta » augmente dans les minutes suivant l'ischémie cérébrale. De même, la protéine TNF- α « Tumor Necrosis Factor alpha » produite dans les premières heures s'accumule au niveau des neurones dans un premiers temps puis secondairement au niveau de la glie. Par ailleurs, la protéine MCP-1 « Monocyte Chemoattractant Protein-1 » est surexprimée environ 12 heures après le début de l'ischémie (Ahmad & Graham, 2010).

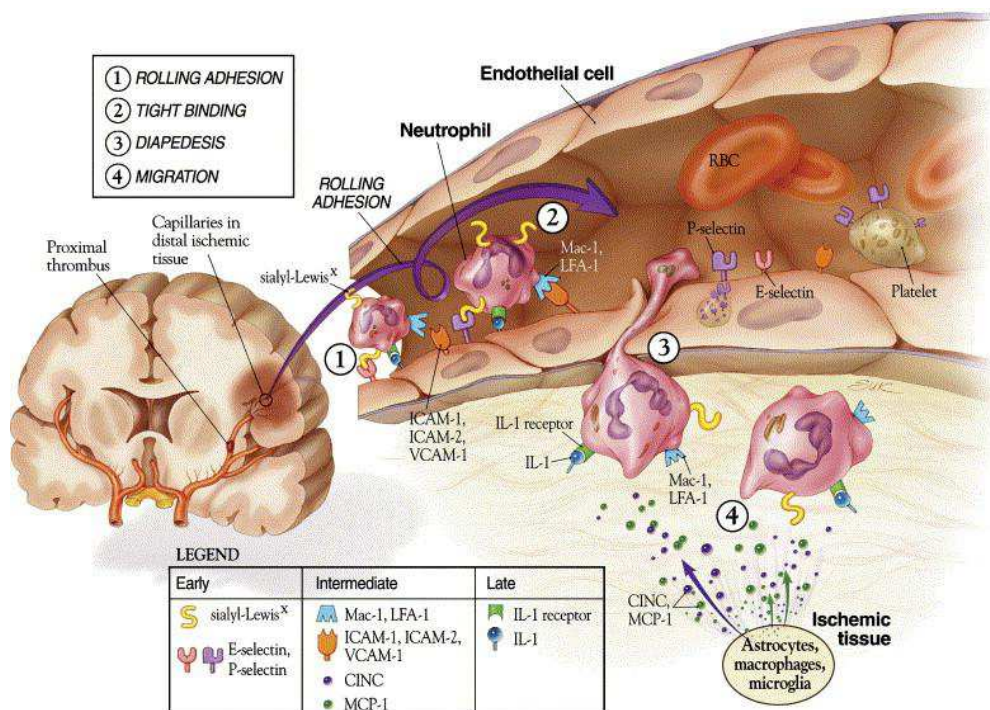


Figure 10 : Cascade inflammatoire induite par une ischémie cérébrale (Huang *et al*, 2006).

La propagation de ces médiateurs active les molécules d'adhésion comme les sélectines entraînant des phénomènes de « rolling » des neutrophiles le long de la paroi des

cellules endothéliales (figure 10), suivie par leur activation et leur adhésion par les intégrines et les immunoglobulines. Cet enchaînement permet un recrutement des neutrophiles au sein du tissu cérébral observé 30 minutes après l'ischémie cérébrale (Doyle *et al*, 2008). Il s'ensuit une libération de radicaux libres de l'oxygène et d'enzymes protéolytiques aggravant les dommages tissulaires par une suractivation de la cascade inflammatoire. La présence des neutrophiles atteint un pic à 3 jours suivant l'ischémie, puis décroît progressivement dans les 10 jours suivants.

Durant la phase aigüe (24 heures après l'ischémie) où les lymphocytes sont recrutés, la rupture de la BHE faciliterait leur passage au sein du cortex cérébral et entraînerait à nouveau une libération de médiateurs pro-inflammatoires. Les macrophages sont également recrutés au sein du tissu cérébral. Quant aux neutrophiles, à 24 heures de reperfusion, ils sont responsables du développement de pétéchies suite à la thrombolyse, aggravant le pronostic (Gautier *et al*, 2009). Cependant, les études peinent encore aujourd'hui à distinguer la microglie activée des macrophages migrés puisque leurs morphologies ainsi que leurs propriétés sont très proches. Néanmoins, leur nombre est bien supérieur à celui des neutrophiles lors de cette phase inflammatoire (Tanaka *et al*, 2003).

VIII.8. Apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée génétiquement très présent dans la zone de pénombre ischémique qui va engendrer un minimum de phénomènes inflammatoires (Choi, 1996). Lors de la reperfusion, cette apoptose est potentialisée grâce à la restauration des pompes énergétiques au sein de la zone de pénombre (Schaller & Graf, 2004). La famille des protéines Bcl-2 intervient de manière prépondérante dans les phénomènes apoptotiques. Elle comprend deux catégories de protéines, les premières vont avoir une action pro-apoptotique telles que Bax, Bid... tandis que les secondes ont une action anti-apoptotique, c'est le cas des protéines Bcl-2, Bcl-xl... Parmi les facteurs déclencheurs de l'apoptose, l'augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} (Choi, 1995), la production de formes réactives de l'oxygène et notamment le NO au niveau mitochondrial (Dugan *et al*, 1995), la réduction de la concentration intracellulaire en K^+ (Yu *et al*, 1997) ou encore une augmentation de l'influx d'ions Zn^{2+} (Koh, 2001) jouent un rôle important. Le Ca^{2+} est un facteur déclencheur primordial de l'apoptose. Les ions Ca^{2+} rentrent dans les neurones par les récepteurs NMDA et AMPA (Szydłowska & Tymianski, 2010). L'augmentation en Ca^{2+} intracellulaire entraîne une augmentation du Ca^{2+} intramitochondrial (Gincel *et al*, 2001 ; Gunter *et al*, 2004 ; Malli & Graier, 2010). Il y a deux grandes voies apoptotiques intriquées que sont la voie intrinsèque et la voie extrinsèque. Dans la voie intrinsèque, les médiateurs précédemment cités et notamment la surcharge en Ca^{2+} vont provoquer la formation d'un pore de transition

mitochondrial de perméabilité membranaire (mPTP) localisé au niveau transmembranaire dans la paroi interne et externe de la mitochondrie. Ce pore mPTP est formé par oligomérisation des protéines Bax et Bak avec libération de cytochrome c. Ce relargage engendre la formation de l'apoptosome, complexe protéique constitué du cytochrome c, de la procaspase 9 « Cysteine-aspartic proteases » et de l'APAF-1 « Apoptotic Protease Activating Factor 1 » activant la caspase 9 qui va en retour activer la caspase 3 (Green & Reed, 1998). D'autre part, la voie extrinsèque fait intervenir les récepteurs de mort qui vont se trimériser et recruter des protéines adaptatrices. Cette liaison entraîne le clivage protéolytique des procaspases 8, 10 et 2 menant à l'activation des caspases 6, 7 et de la caspase 3 déjà activée par la voie intrinsèque (figure 11).

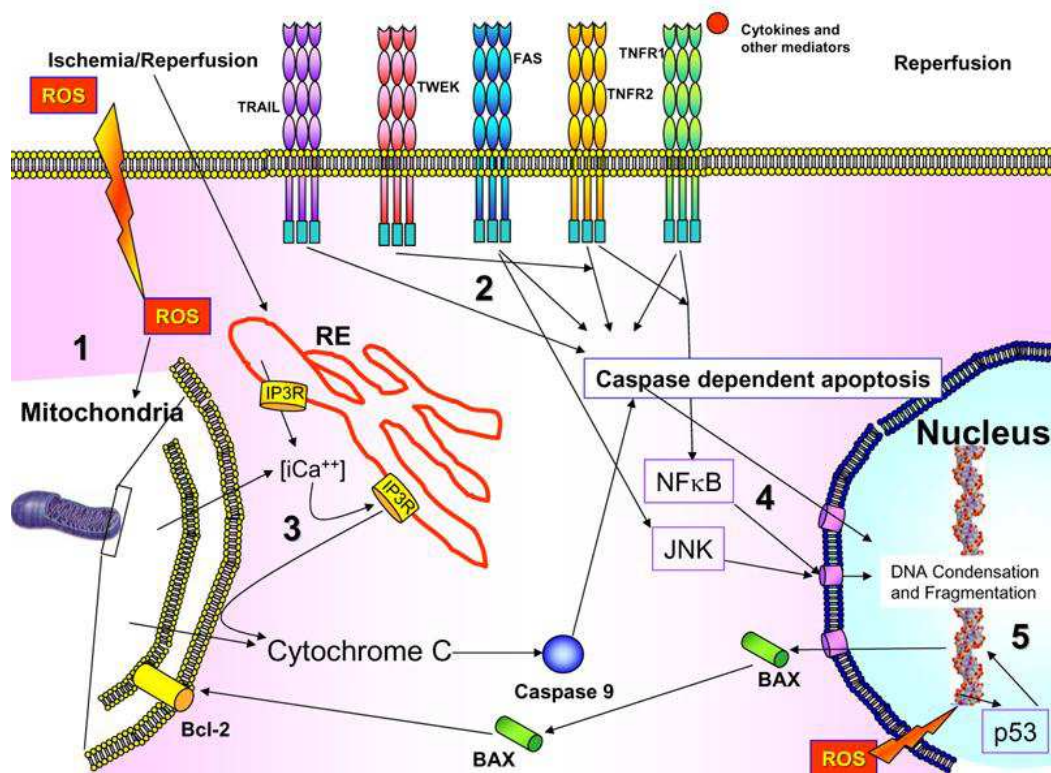


Figure 11 : Activation des voies apoptotiques (intrinsèque et extrinsèque) lors d'une ischémie-reperfusion (Lopez-Neblina *et al*, 2005).

Ces protéines induites vont agir sur les cellules en perturbant les processus physiologiques tels que la régulation de l'homéostasie, l'organisation du cytosquelette, les voies de signalisation cellulaire et en provoquant la fragmentation de l'ADN.

IX. Conséquences fonctionnelles d'un AVC

Dès leur prise en charge, après un épisode ischémique, les patients subissent régulièrement différents tests d'évaluation fonctionnelle, afin de mesurer la sévérité initiale du déficit puis son suivi à long terme.

IX.1. Capacités motrices

IX.1.1. Tests d'évaluation

Les recherches ainsi que la prise en charge s'améliorant, le risque de décès dans les premiers mois a diminué. Par conséquent, l'espérance de vie des patients a augmenté c'est pourquoi le suivi à long terme doit être accentué au même titre que les études à court terme. A cette fin, les patients victimes d'un AVC, effectuent régulièrement des contrôles afin de déceler l'évolution de leurs lésions et de leurs fonctions. Plusieurs tests sont pratiqués à différentes périodes du suivi, évaluant les capacités motrices afin de connaître le degré de récupération fonctionnelle du patient et définir son autonomie dans la vie quotidienne.

Le score NIHSS « National Institute of Health Stroke Scale », mis en place en 1989, permet d'évaluer de manière précise la sévérité de l'AVC ischémique lors de sa phase aiguë (Brott *et al*, 1989). Ce score neurologique varie de 0 (normal) à 42 (gravité maximale) et permet l'évaluation de plusieurs paramètres (figure 12).

Ce test permet de prédire le devenir du patient à courte échéance, 80% des patients ayant un score initial inférieur ou égal à 5 rentreront au domicile dès la fin de la prise en charge hospitalière aiguë. Un patient ayant un score compris entre 6 et 13 sollicitera une prise en charge dans un service de rééducation car la perte de fonction est handicapante et ne permet pas un retour au domicile immédiatement. En revanche, un score supérieur ou égal à 14 sera d'un très mauvais pronostic pour le patient qui nécessitera des soins continus dans des établissements spécialisés avant d'envisager un retour au domicile (Schlegel *et al*, 2003).

1a Niveau de conscience	0 : vigilance normale, réponses aisées
	1 : non vigilant, éveillable par des stimulations mineures pour répondre ou exécuter les consignes
	2 : non vigilant, requiert des stimulations répétées pour maintenir son attention ; ou bien est obnubilé et requiert des stimulations intenses ou douloureuses pour effectuer des mouvements non automatiques
	3 : répond seulement de façon réflexe ou totalement aréactif
1b Questions : le patient est questionné sur le mois et son âge	0 : réponses correctes aux deux questions
	1 : réponse correcte à une question
	2 : aucune réponse correcte
1c Commandes: Ouvrir et fermer les yeux, serrer et relâcher la main non parétique	0 : exécute les deux tâches correctement
	1 : exécute une tâche correctement
	2 : n'exécute aucune tâche
2 Oculomotricité : seuls les mouvements horizontaux sont évalués	0 : normal
	1 : paralysie partielle ; le regard est anormal sur un œil ou les deux, sans déviation forcée du regard ni paralysie complète
	2 : déviation forcée du regard ou paralysie complète non surmontée par les reflexes oculo-céphaliques

3 Vision	0 : aucun trouble du champ visuel
	1 : hémianopsie partielle
	2 : hémianopsie totale
	3 : double hémianopsie, incluant cécité corticale
4 Paralyse faciale	0 : mouvement normal et symétrique
	1 : paralysie mineure (affaissement du sillon nasogénien ; sourire asymétrique)
	2 : paralysie partielle : paralysie totale ou presque de l'hémiface inférieure
	3 : paralysie complète d'un ou des deux côtés
5 Motricité Membres Supérieurs : bras tendu à 90° en position assise, à 45° en décubitus durant 10 secondes	0 : pas de chute
	1 : chute vers le bas avant 10 secondes sans heurter le lit
	2 : effort contre pesanteur possible mais le bras ne peut atteindre ou maintenir la position et tombe sur le lit
	3 : aucun effort contre pesanteur, le bras tombe
	4 : aucun mouvement
6 Motricité Membres Inférieurs : jambes tendues à 30° pendant 5 secondes	0 : pas de chute
	1 : chute avant 5 secondes, les jambes ne heurtant pas le lit
	2 : effort contre pesanteur mais la jambe chute sur le lit
	3 : pas d'effort contre pesanteur
	4 : aucun mouvement
7 Ataxie	0 : absente
	1 : présente sur un membre
	2 : présente sur deux membres
8 Sensibilité : sensibilité à la piqûre ou réaction de retrait après stimulation nociceptive	0 : normale, pas de déficit sensitif
	1 : hypoesthésie modérée: le patient sent que la piqûre est atténuée ou abolie mais a conscience d'être touché
	2 : anesthésie: le patient n'a pas conscience d'être touché
9 Langage	0 : normal
	1 : aphasie modérée: perte de fluence verbale, difficulté de compréhension sans limitation des idées exprimées ou de la forme de l'expression
	2 : aphasie sévère: expression fragmentaire, dénomination des objets impossibles; les échanges sont limités, l'examineur supporte le poids de la conversation
	3 : aphasie globale: mutisme; pas de langage utile ou de compréhension du langage oral
10 Dysarthrie	0 : normal
	1 : modérée: le patient bute sur certains mots, au pire il est compris avec difficultés
	2 : sévère : le discours est incompréhensible, sans proportion avec une éventuelle aphasie ; ou bien le patient est mutique ou anarthrique
11 Extinction et négligence	0 : pas d'anomalie
	1 : négligence ou extinction visuelle, tactile, auditive ou personnelle aux stimulations bilatérales simultanées
	2 : hémignégligence sévère ou extinction dans plusieurs modalités sensorielles ; ne reconnaît pas sa main ou s'oriente vers un seul héli-espace

Figure 12 : Evaluation de la sévérité par l'échelle NIHSS

Cependant, ce score ne permet pas l'évaluation précise de l'atteinte des nerfs crâniens et ne peut être utilisé pour certaines zones de l'encéphale comme le tronc cérébral ou le cervelet car il peut sous-évaluer la gravité d'un infarctus dans ces régions.

Le test initial du Rankin crée en 1957 (Rankin, 1957) et modifié en 1988 (Van Swieten *et al*, 1988) afin d'améliorer sa compréhension et son interprétation demeure encore à ce jour, un test largement utilisé afin d'évaluer le handicap résiduel du patient (New & Buchbinder, 2006). L'échelle de Rankin modifié (mRS) est divisée en six points (figure 13).

0 – Aucun symptôme
1 – Pas d'incapacité significative en dehors d'éventuels symptômes
- capable d'assumer ses rôles
- capable de mener ses activités
2 – Légère incapacité
- incapable de mener à bien toutes ses activités antérieures
- capable de mener ses propres affaires sans assistance
3 – Incapacité modérée
- requiert certaines aides
- capable de marcher sans assistance
4 – Incapacité modérément sévère
- incapable de marcher sans assistance
- incapable de s'occuper de ses propres besoins sans assistance
5 – Incapacité sévère
- confiné au lit, incontinent et
- nécessitant une attention et des soins constants de nursing

Figure 13 : Evaluation du handicap par le score de Rankin

L'index de Barthel employé à partir du 7^{ème} jour suivant la survenue de l'AVC, permet d'évaluer la récupération fonctionnelle du patient à travers les aspects de la vie quotidienne comme la mobilité et l'indépendance vis-à-vis des gestes du quotidien (Mahoney & Barthel, 1965). Ce score varie de 0 à 100 et est établi à travers 10 items. Un score de 0 indique une dépendance complète du patient tandis qu'un score de 100 indique l'autonomie. De plus, ce test permet de prédire avec certitude l'indépendance du patient à plus long terme (figure 14).

Une de ses limites est qu'il ne permet pas d'évaluer la cognition, le langage, la vue, l'état émotionnel ainsi que la douleur relative aux désordres suivant l'AVC.

Items	Avec aide	Indépendant
Alimentation (avec aide si nécessaire pour couper les aliments)	5	10
Transfert du fauteuil au lit et retour (peut s'asseoir dans son lit)	5-10	15
Toilette personnelle (se laver le visage, se coiffer, se raser, se laver les dents)	0	5
Transfert aux et des toilettes (y compris déshabillage, s'essuyer, tirer la chasse)	5	10
Se baigner seul	0	15
Marche en terrain plat (ou si marche impossible, utilisation du fauteuil roulant)	0	5
Monter et descendre les escaliers	5	10
Habillage (y compris nouer les lacets, attacher les fermetures)	5	10
Contrôle intestinal	5	10
Contrôle vésical	5	10

Figure 14 : Evaluation de la sévérité par l'index de Barthel

IX.1.2. Sévérité du déficit fonctionnel

En clinique, les études réalisées grâce à l'ensemble de ces tests ont permis de rassembler de nombreuses données sur les déficits observés au décours d'un AVC et la récupération. Afin d'avoir un suivi, des évaluations ultérieures sont effectuées à différents intervalles de temps. Lors d'une étude publiée en 1995, des patients âgés en moyenne de 66 ans et présentant un premier épisode ischémique montrent un score NIHSS médian à 14 compris entre 1 et 33 lors de l'admission. 24 heures après, ce score est diminué avec des valeurs s'échelonnant entre 6 et 19 avec une médiane à 12. 90 jours après l'AVC, au début de la phase chronique, ces mêmes patients sont revus et soumis à plusieurs tests car les déficits sont constitués à cette date. 21 % sont décédés, 27 % présentent un score NIHSS supérieur à 9, 32 % ont un score compris entre 2 et 8 et 20 % ont un score inférieur ou égal à 1, c'est-à-dire une récupération complète (NINDS, 1995). Dans cette même étude, le mRS montre les mêmes proportions tandis que l'index de Barthel évalue à 38 % le nombre de patients ayant recouvré leur autonomie avec un score compris entre 95 et 100. 23 % ont un score compris entre 55 et 90 et doivent bénéficier d'une aide. 18 % ont un score inférieur à 50 et ne sont par conséquent plus autonomes (NINDS, 1995).

Le score initial du NIHSS est également prédictif du déficit final, un score initial compris entre 12 et 14 est prédictif d'une récupération bonne à excellente dans 80 % des cas, un score au-dessus de 20 à 26 est prédictif d'une récupération bonne à excellente dans moins de 20 % des cas (Adams *et al*, 1999).

En parallèle de ces tests, la réalisation d'un scanner précoce et de la quantification d'hypointensité localisée dans le parenchyme permet de prédire le déficit fonctionnel de post-ischémie chez les patients thrombolysés. Les patients qui présentent peu

d'hypointensité réagissent mieux à la thrombolyse tandis que des patients ayant un scanner normal ou une quantité d'hypointensité élevée ne tirent pas de bénéfice d'une thrombolyse car le risque hémorragique est plus élevé (Von Kummer *et al*, 1997).

La notion de récupération d'un patient passe par sa capacité à gérer sa vie quotidienne. De nombreuses études se sont focalisées sur la récupération fonctionnelle lors de la phase chronique. Dans une étude multi-ethnique et multi-factorielle menée sur 5 ans à Auckland, le score NIHSS met en évidence un déficit modéré chez 71 % des 418 participants. 68,6 % des patients ont un mRS inférieur à 3 reflétant une bonne récupération et 70,6 % se déclarent indépendants vis-à-vis des gestes du quotidien (index de Barthel). Toutefois, parmi cette population, un tiers des patients présentent un problème de contrôle vésical et ont chuté au minimum une fois au cours de l'année suivant la survenue de l'AVC (Feigin *et al*, 2010). Récemment, un suivi sur 11 ans a permis de mesurer la perte d'autonomie via l'index de Barthel. L'originalité de ce travail consiste en une étude comparative, avant et après un premier épisode ischémique, dans une population multi-ethnique et possédant des facteurs de prédisposition à l'AVC. Menée sur la cohorte du nord de Manhattan, elle inclut 210 patients suivis 5,6 ans avant l'épisode ischémique et 4,9 ans après celui-ci. Dans un modèle ajusté, les résultats soulignent une différence au niveau du déclin fonctionnel selon la période étudiée. Avant l'épisode ischémique, les patients ont un score de 91,8 résultant d'une perte de 0,58 point par an. La survenue d'un AVC entraîne une chute de 15,9 points de ce score et suite à cet épisode ischémique, le déclin fonctionnel s'accélère avec une perte de 1,94 point par an par la suite (Dhamoon *et al*, 2012). Sur une cohorte de 269 patients ayant survécu 10 ans après un AVC, l'index de Barthel montre une stabilisation du taux d'indépendance des patients au décours de la période de suivi (Wolfe *et al*, 2011).

Ces travaux effectués sur le suivi à long terme au décours d'un AVC ont permis de réunir des données primordiales sur le devenir fonctionnel des patients. Ils reflètent une capacité de récupération pour la majorité d'entre eux, et pour une minorité un handicap majeur ne permettant pas leur indépendance dans leur vie quotidienne.

IX.2. Capacités mnésiques

IX.2.1. Tests d'évaluation

Le deuxième impact majeur des AVC est l'apparition d'un déficit cognitif qui peut perdurer indépendamment de la récupération fonctionnelle. Afin de l'évaluer, le test du MMSE « Mini-Mental State Examination », apparu en 1975 grâce à Folstein reste aujourd'hui un test de référence pour les neurologues, les gériatres ou les psychologues. Ce test

comporte 30 questions et permet d'évaluer en 7 à 10 minutes, différents aspects cognitifs (Folstein *et al*, 1975) (figure 15).

Orientation dans le temps
Quelques questions sont posées afin d'apprécier le fonctionnement de la mémoire.
Quelle est la date complète d'aujourd'hui ?
En quelle année sommes-nous ?
En quelle saison ?
En quel mois ?
Quel jour du mois ?
Quel jour de la semaine ?
Orientation dans l'espace
Endroit où nous nous trouvons
Quel est le nom de l'hôpital où nous sommes ?
Dans quelle ville se trouve-t-il ?
Quel est le nom du département dans lequel est située cette ville ?
Dans quelle province ou région est situé ce département ?
A quel étage sommes-nous ?
Apprentissage
3 mots à faire répéter au patient qui doit essayer de les retenir. Ils seront redemandés ensuite
Attention et calcul
Faire des soustractions successives à partir de 100 et en retirant 7 à chaque fois.
93 - 86 - 79 - 72 - 65
Epreuve de mémoire
Rappel des 3 mots qu'il fallait retenir
Epreuves portant sur le langage
Montrer un objet, le faire nommer, répéter des mots, obéir à des ordres simples permettent d'évaluer différentes fonctions cognitives
Praxies constructives
La praxie est évaluée en donnant une feuille de papier et en demandant de recopier une figure complexe

Figure 15 : Evaluation cognitive par le test du MMSE

Le score maximum est de 30 points, plus ce score est faible, plus le déficit est prononcé. Le seuil de 24 points est discriminant d'un déclin cognitif et un score inférieur à 10 est un seuil critique où le patient est déclaré dément lors d'un cas d'AVC.

Cependant, le test du MMSE a plusieurs limites. Le diagnostic de démence ne peut être posé car les items évalués ne permettent pas de couvrir l'ensemble des désordres qui peuvent résulter lors des maladies démentielles connues aujourd'hui (démence à corps de Lewy, maladie d'Alzheimer...). Par ailleurs, plusieurs facteurs entrent en compte dans l'exploitation du résultat tel que le niveau socioculturel ainsi que l'âge du patient.

IX.2.2. Sévérité du déficit mnésique

Les études cliniques utilisant le test du MMSE à court terme sont assez peu nombreuses car l'apparition d'un déclin cognitif significatif impacte le patient à long terme. Dans les 3 jours suivant l'AVC, chez des patients âgés en moyenne de 75 ans, le score MMSE est chiffré à 22,5 signifiant un déclin cognitif (Mizrahi *et al*, 2011). 12 jours en moyenne après un AVC, lors de la phase subaigüe, une autre étude a trouvé un score MMSE de 24,4 (Jeong *et al*, 2012). Ces scores à court terme sont assez proches et reflètent un déclin cognitif débutant. L'altération des fonctions cognitives moins de 2 semaines après l'AVC se traduit essentiellement par un déficit attentionnel (48,5 % des patients), une aphasie (27 %), un déficit de la mémoire à court terme (24,5 %), une dysfonction exécutive (18,5 %) et à plus faible échelle un déficit de la mémoire à long terme (Lesniak *et al*, 2008).

Le handicap d'un patient comprend bien évidemment sa capacité à être autonome au quotidien mais également les interactions sociales, au sens large du terme, que le sujet peut avoir avec son entourage.

A des degrés divers, l'AVC a des conséquences sur tous les domaines touchant de près ou de loin la cognition. Un suivi de la cohorte d'Erlangen Stroke Project, montre un déficit cognitif en réponse au test du MMSE suite à un AVC ischémique. A 3 mois, 14,8 % des patients ont un déclin cognitif, 13,3 % à 1 an, et 11,8 % à 3 ans. Plus précisément, sur les 14,8 % ayant un déclin cognitif à 3 mois, 31 % auront récupéré de leur déficit dans les 3 ans. Par ailleurs, en ce qui concerne les patients pour lesquels aucun déficit n'est observé à 3 mois, chez 71 % d'entre eux, il en sera de même à 3 ans (Liman *et al*, 2011). 1 an après un premier événement ischémique, une étude a caractérisé la récurrence du déficit attentionnel chez les patients (53,75 %), suivi par un déficit de la mémoire à court terme (36,25 % des patients). 16,25 % présentent une aphasie tandis que le déficit de la mémoire à long terme et l'apraxie sont beaucoup moins fréquents puisque seuls 6,25 % des patients présentent ce déficit (Lesniak *et al*, 2008). Sur un suivi allant de 3 à 6 ans sur la cohorte de Honolulu, un état de déficit cognitif léger a été démontré. Avant 3 ans, les déficits sont plus marqués quant à la mémoire épisodique, le langage, la fluidité verbale, ainsi que l'orientation. De 3 à 6 ans les déficits liés à la mémoire épisodique sont présents. A 6 ans de suivi, 52 patients sont déclarés déments en comparaison aux 1559 patients contrôles (Jorm *et al*, 2005). Dans la cohorte de Londres, une fluctuation de ces déficits cognitifs est observée de 7 jours à 8 ans. En revanche, à partir de 8 ans et dans les deux années qui suivent, l'incidence du déclin cognitif augmente rapidement pour atteindre une incidence d'environ 50 % (Wolfe *et al*, 2011). Il y a des disparités quant au déficit cognitif suite à un AVC, il est important d'étudier et de déterminer de possibles corrélations entre AVC et démence.

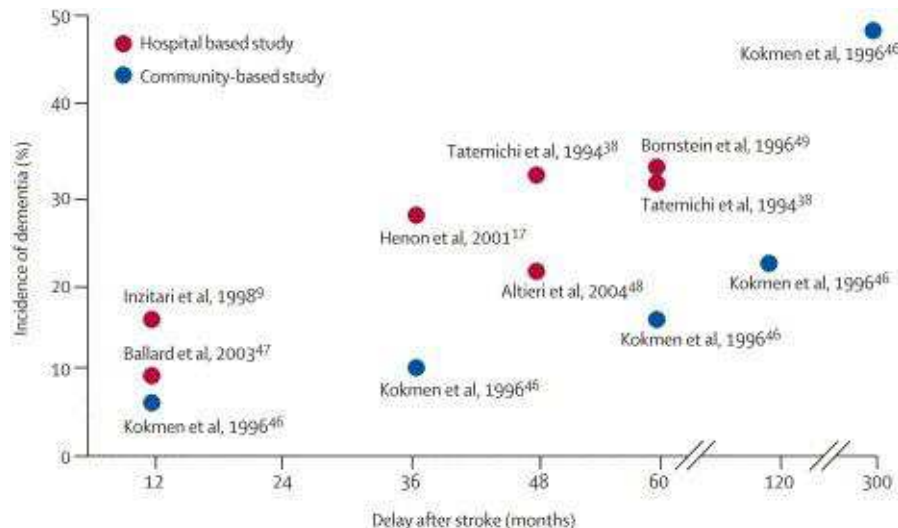


Figure 16 : Incidence de la démence survenant après un AVC en fonction du temps basée sur des études faites en milieu hospitalier ou en communauté (Leys *et al*, 2005).

Différentes études ont démontré que le risque de démence post-AVC augmentait au décours du temps suite à un épisode ischémique (figure 16) et que l'âge des patients jouait un rôle prépondérant. Cependant, les résultats peuvent différer selon les critères d'exclusion employés (Inzitari *et al*, 1998). Chez les patients âgés de plus de 40 ans, la prévalence de la démence est de 22,8 % à 6 mois et reste stable jusqu'à 3 ans après le premier événement (Hénon *et al*, 2001). A 1 an, 16,8 % des patients présentent une démence post-AVC, l'incidence est de 33,3 % chez ces patients après 52 mois de suivi (4,3 ans) avec un risque 5 fois plus élevé de développer une démence par rapport à des sujets contrôles. A 9 ans de suivi, le risque de démence est multiplié par 6 avec une incidence de 50 % (Tatemichi *et al*, 1994).

Chez les patients âgés de plus de 75 ans, non déments à 3 mois post-AVC, la prévalence à 1 an est de 9 % (Ballard *et al*, 2003) et à 4 ans, cette incidence passe à 21 % (Altieri *et al*, 2004). La plus longue étude porte sur un suivi sur 25 ans et a démontré une incidence de la démence post-AVC à 7 % à 1 an, 10 % à 3 ans, 15 % à 5 ans, 23 % à 10 ans et 48 % à 25 ans (Kokmen *et al*, 1996).

IX.3. Désordre émotionnel

Depuis peu, les études cherchent à prendre en charge les désordres émotionnels survenant chez les patients à la suite d'un AVC. Une étude menée au Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille a permis de suivre l'évolution de l'état dépressif de ces patients jusqu'à 3 ans après l'AVC. La survenue de dépressions au cours du temps décroît progressivement pour passer d'une prévalence de 43 % à 6 mois à 18 % à 3 ans de suivi avec une faible proportion (<4 %) de dépressions sévères. Parmi les aspects affectifs les

plus touchés, on peut citer la perte d'énergie, la perte d'intérêt, le peu d'estime de soi, un sommeil difficile. Ce travail a, de plus, permis de démontrer l'incidence d'une démence sur la dépression puisque les patients déments ont tendance à être plus souvent dépressifs par comparaison aux patients non déments (Verdelho *et al*, 2004). A 5 ans, une étude menée sur la cohorte d'Auckland a montré un taux de 29,6 % de cas dépressifs chez des patients ayant eu un AVC (Feigin *et al*, 2010). A long terme, les résultats de la cohorte de Londres distinguent le stade dépressif du stade anxieux. Les taux de patients qui présentent une anxiété ou une dépression fluctuent sur une période de 10 ans avec en moyenne 350 ‰ de cas d'anxiété et 310 ‰ de cas dépressifs (Wolfe *et al*, 2011).

X. Conséquences lésionnelles d'un AVC

Lors de la prise en charge du patient, la priorité est de déterminer s'il s'agit bien d'un AVC, et secondairement, s'il s'agit d'un épisode ischémique ou hémorragique puisque les options thérapeutiques diffèrent selon le résultat.

X.1. Lésions tissulaires : imagerie

L'imagerie est, lorsque cela est possible, le premier examen effectué chez tout patient suspecté d'AVC afin d'en connaître le type et d'évaluer le territoire lésé.

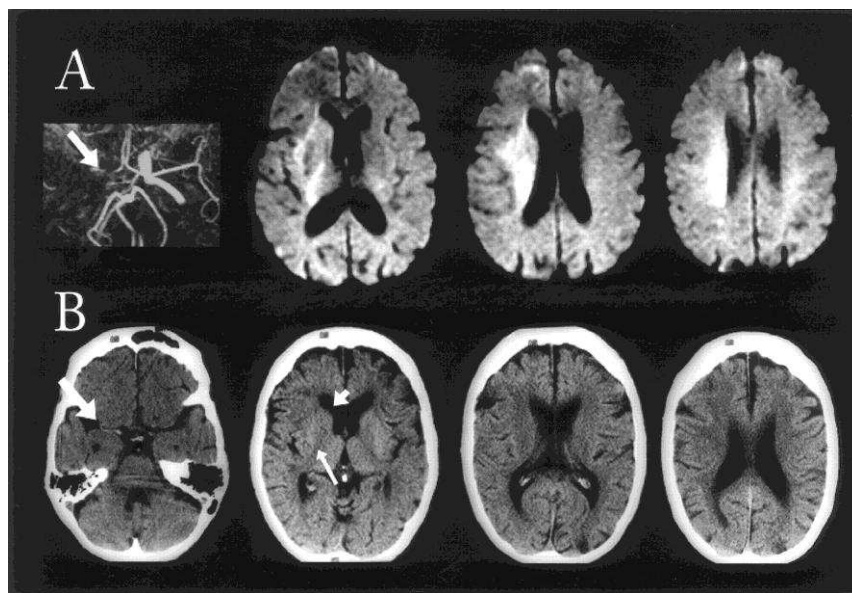


Figure 17 : Imagerie obtenue chez un patient suspecté de faire un AVC (A) AngioIRM (à gauche) montrant l'occlusion de l'artère sylvienne droite (flèche) et séquence DWI (à droite) montrant une région en hyperintensité de la zone ischémique située dans les régions sous-corticales et dans le ganglion basal. (B) Scanner montrant une hyperintensité au niveau de l'artère sylvienne (flèche) et une hypointensité au niveau du noyau caudé et du putamen (petites flèches) (Barber *et al*, 1999).

Au niveau du territoire irrigué par l'artère cérébrale moyenne (ACM) ou artère sylvienne, le plus fréquemment touché (Mohr *et al*, 1986), il est possible de graduer la

sévérité de l'AVC par l'utilisation du score ASPECTS « Alberta Stroke Program Early CT Score ».

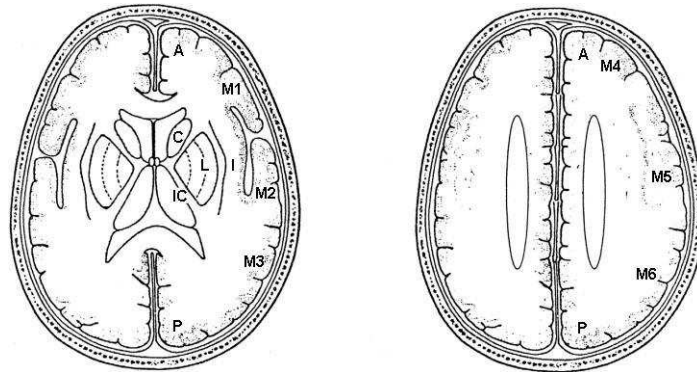


Figure 18 : Carte permettant l'évaluation du score ASPECTS : A=circulation antérieure ; P=circulation postérieure ; C=Noyau Caudé ; L=Noyau Lenticulaire ; IC=Capsule interne ; I=Ruban insulaire ; MCA=artère cérébrale moyenne ; M1=Cortex antérieur à l'ACM ; M2=Cortex latéral à l'ACM ; M3=Cortex postérieur à l'ACM ; M4, M5, et M6 : Cortex antérieur, latéral et postérieur aux territoires de l'ACM respectivement à 2 cm au-dessus de M1, M2 et M3 (Barber *et al*, 2000).

Le territoire irrigué par l'ACM est subdivisé en 10 zones, et pour chacune, l'examineur déduit 1 point si celle-ci change d'aspect au scanner (figure 18). Un score est calculé reflétant la sévérité de l'infarctus au niveau sylvien, 10 correspond au score d'un scanner normal, à l'inverse plus on se rapproche d'un score de 0, plus le territoire est touché (Barber *et al*, 2000).

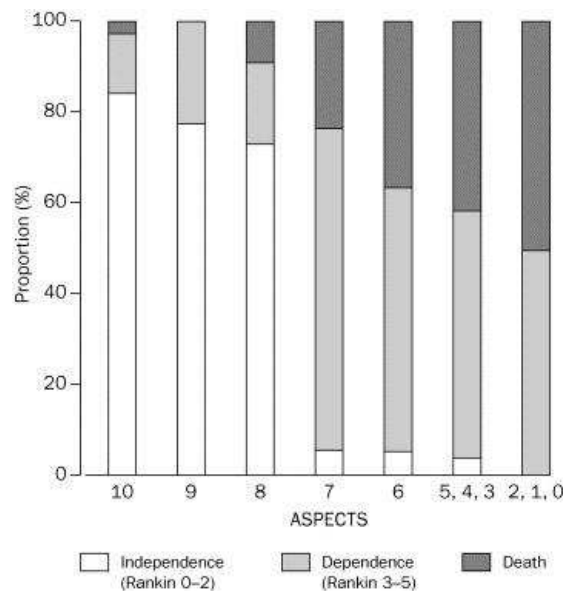


Figure 19 : Proportion selon le score de Rankin et le taux de décès chez des patients trois mois après la survenue de l'AVC en fonction de leur score ASPECTS à l'admission (Barber *et al*, 2000).

Le score ASPECTS initial permet de prévoir le handicap résiduel à 3 mois chez ces patients par l'étude du mRS. Plus le score ASPECTS est faible, plus la proportion de patients décédés est élevée (50 % de décès constatés dans les 3 premiers mois pour un

score inférieur à 2) (figure 19). A l'inverse, plus le score ASPECTS est élevé, meilleur est le pronostic avec un mRS inférieur à 2 signifiant une indépendance du patient (plus de 80 % des patients) (Barber *et al*, 2000).

L'examen par IRM « Imagerie par Résonance Magnétique » possède un degré de sensibilité bien supérieur au scanner et permet de distinguer une hémorragie d'une ischémie. En présence d'un AVC ischémique, les séquences employées diffèrent au cours du temps puisque la physiopathologie du tissu touché va évoluer (figure 20).

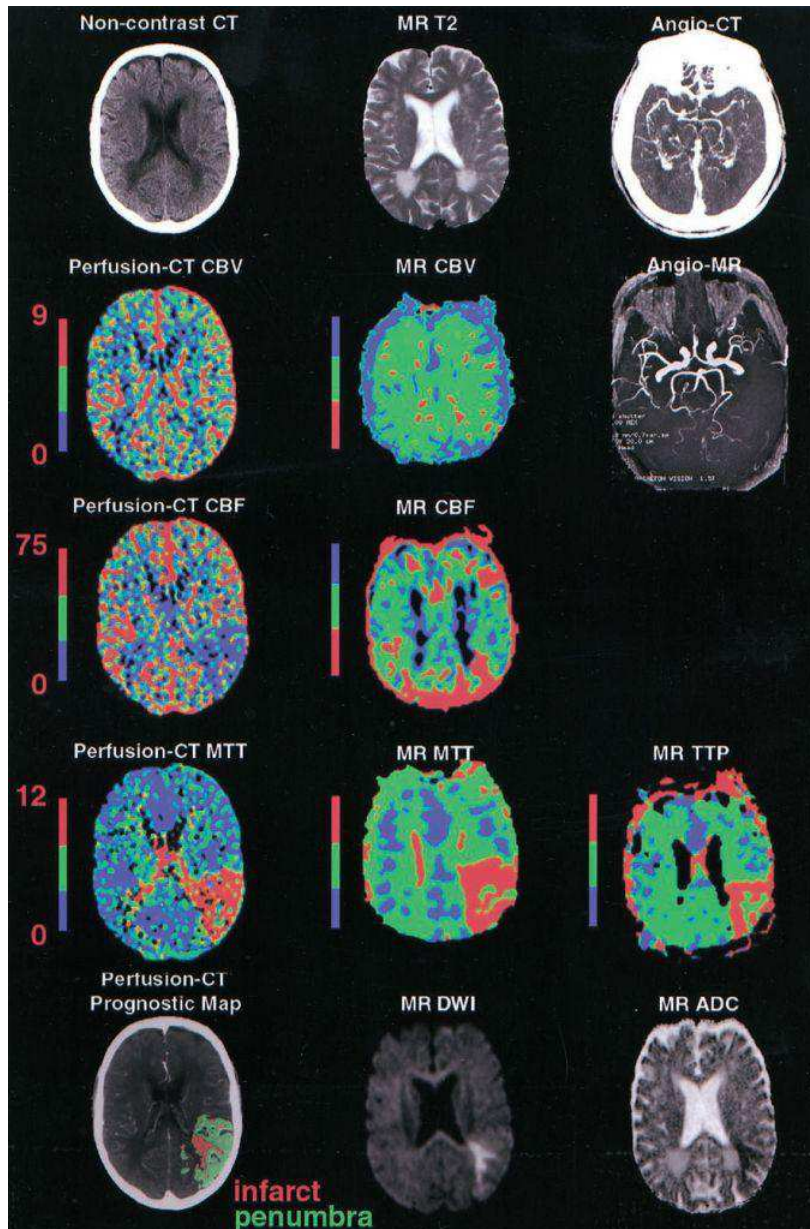


Figure 20 : Imagerie d'un patient de 71 ans présentant soudainement un hémisyndrome moteur droit de la face et des membres associé à une aphasia. Les différentes séquences montrent une occlusion de l'ACM gauche au niveau du cortex antérieur et latéral (Wintermark *et al*, 2002).

L'injection au préalable au patient d'une solution iodée permet d'effectuer deux types de séquence plus précises : (i) une angiographie sous scanner pour observer les artères à partir de la crosse aortique jusqu'aux extrémités distales des grosses artères intra-crânielles et détecter un site éventuel de dissection artérielle, une diminution du DSC ou une rupture d'anévrisme (Ledezma & Wintermark, 2009) ; (ii) un scanner de perfusion qui permet d'avoir une étude dynamique de la perfusion cérébrale. Le produit de contraste est injecté au fur et à mesure et le renforcement au niveau de l'image est proportionnel à la concentration d'agent de contraste dans les vaisseaux. Cette technique a l'avantage de pouvoir discriminer le cœur de l'infarctus de la pénombre ischémique (Wintermark *et al*, 2002).

En première intention, la séquence DWI « Diffusion Weighted Imaging » va permettre de visualiser l'absence de liberté de mouvement des protons. Lors d'une ischémie, un œdème se forme, lié à une augmentation du volume cellulaire suite à la défaillance des pompes Na^+/K^+ ATPase neuronales. L'espace extracellulaire diminue, restreignant la liberté de mouvements de ces molécules d'eau et provoquant un hypersignal. Ce phénomène débute quelques minutes après l'occlusion (Hjort *et al*, 2005) et perdure au-delà d'une semaine ce qui rend cette séquence extrêmement fiable pour détecter un AVC de type ischémique (Barber *et al*, 1999).

La séquence ADC « Apparent Diffusion Coefficient » peut être utilisée pour dépister les phénomènes précoces de l'ischémie et reflète également le degré de liberté de mouvement des molécules d'eau au niveau de l'espace extracellulaire via une notion de vitesse de diffusion des protons dans les trois directions. Les zones où ce coefficient sera diminué seront des zones dans lesquelles il existe un œdème diminuant ainsi les espaces extracellulaires. Des cartes d'ADC sont reconstituées par un logiciel afin d'identifier les zones concernées (Desmond *et al*, 2001).

Aujourd'hui, l'usage de l'IRM est recommandé dans la prise en charge des patients car cet outil est plus sensible en comparaison du scanner et permet d'éviter l'irradiation du patient, contrairement à l'IRM où les contre-indications se résument à la présence de métal magnétique chez le patient ou une claustrophobie/agitation.

X.2. Lésions de la substance blanche

Des études par IRM ont montré des réarrangements s'opérant au sein du cerveau après un AVC comme l'apparition de lésions au sein de la substance blanche visibles par un hypersignal en séquence T2. Chez des patients ayant subi un AVC ou un AIT, examinés dans un délai de 3 à 6 mois suivant l'épisode, une augmentation de la présence de lésions

de la substance blanche, au niveau de la substance blanche profonde comme au niveau péri-ventriculaire est observée (Sachdev *et al*, 2006).

Au sein de la population de Honolulu, les lésions de la substance blanche observées en dehors d'un contexte de démence préexistante, sont prédictives d'un déclin cognitif apparaissant 5 ans plus tard chez 34,4 % des patients versus 22,4 % des patients qui ne présentent pas de lésions de la substance blanche (Inaba *et al*, 2011).

X.3. Boucle tri-synaptique

L'hippocampe est une petite structure sous-corticale enroulée sur elle-même et occupant la face médiane du lobe temporal. Situé légèrement en profondeur et saillant dans le ventricule latéral, il est recouvert en grande partie par la circonvolution parahippocampale à laquelle il est relié par le subiculum et le cortex entorhinal (figure 21). Attaché à la face dorsale de l'hippocampe se trouve un épais ruban de fibres, la fimbria de l'hippocampe, qui constitue le fornix et se termine au niveau du corps mamillaire. Connectées à l'amygdale, au septum et au thalamus, ces structures constituent les éléments principaux du système limbique, jouant un rôle fondamental dans l'apprentissage et les émotions.

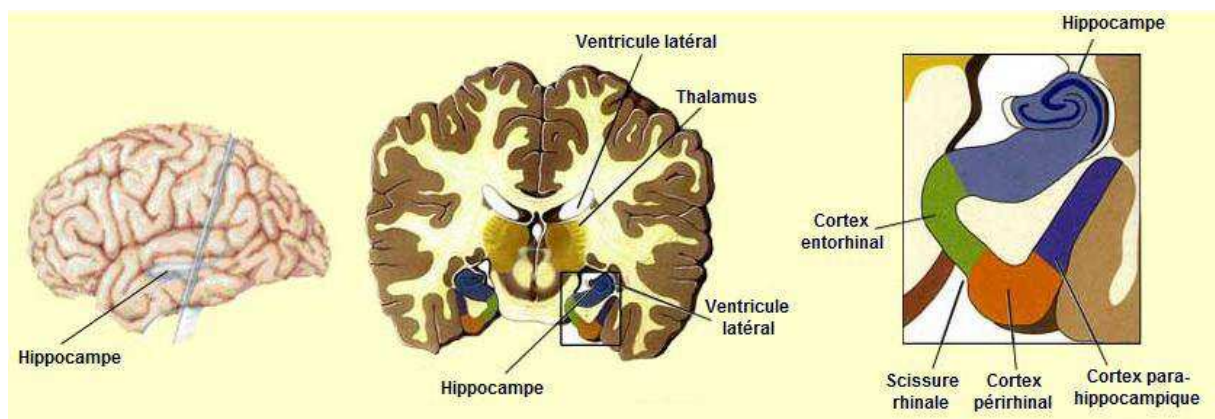


Figure 21 : Place de l'hippocampe au sein du cerveau

L'hippocampe est divisé en deux structures : le gyrus denté (DG) et la corne d'Ammon (CA). Selon la morphologie cellulaire, la corne d'Ammon est elle-même subdivisée en quatre parties : les régions CA1, CA2, CA3 et CA4 (figure 22C).

Le DG contient trois couches de cellules : la couche moléculaire, la couche granulaire et la couche polymorphe ou hile. La CA contient cinq couches de cellules : le *stratum pyramidale*, le *stratum oriens*, le *stratum radiatum*, le *stratum lacunosum* et le *stratum lucidum*. Le subiculum est une région qui va relier le cortex entorhinal à l'hippocampe et par lequel vont transiter les informations nerveuses. Le cortex entorhinal est

une région composée de six couches (de I à VI) reliée aux deux structures précédemment citées (figure 22B).

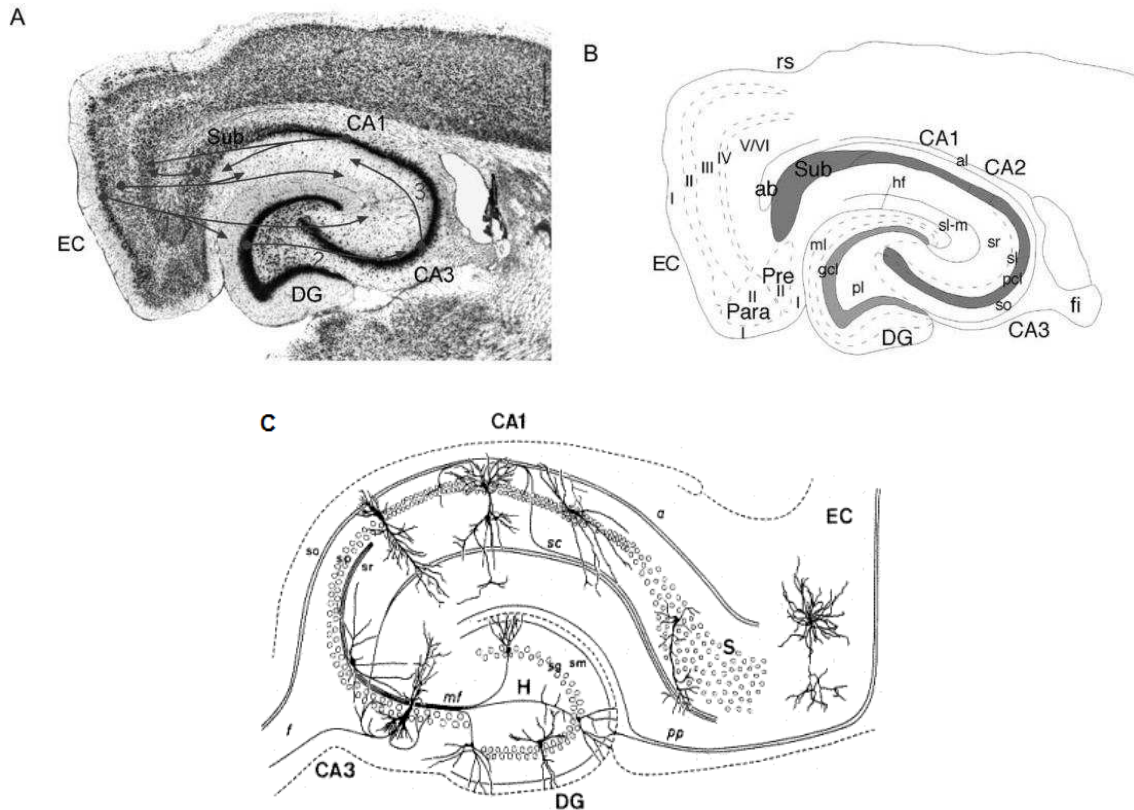


Figure 22 : Organisation de l'hippocampe (A) Schématisation de la boucle tri-synaptique, (B) Organisation des différentes couches cellulaires, (C) Anatomie des cellules selon les couches cellulaires (Amaral et al, 2007).

Les différentes cellules composant ces régions vont projeter des afférences internes et externes. Ces projections vont former une boucle dite tri-synaptique à travers laquelle le flux d'informations est effectué de manière unidirectionnelle (figure 22A). Le cortex entorhinal projette des afférences sur le DG et plus précisément sur les cellules de la couche granulaire par la voie perforante. En réponse, les axones des cellules granulaires, les fibres moussues composant la couche polymorphe contactent les cellules pyramidales de la CA3, qui vont envoyer des axones, appelés collatérales de Schaffer, à travers le *stratum pyramidale* vers l'aire CA1. Cette zone envoie des projections vers le subiculum puis la couche V du cortex entorhinal. Cette boucle constitue la principale voie de relais de l'information nerveuse. Cependant, le cortex entorhinal peut également projeter des afférences vers les régions CA1, CA3 et le subiculum.

Par ailleurs, l'hippocampe projette des efférences externes en provenance de l'hippocampe controlatéral, du cortex entorhinal, du septum médian et du tronc cérébral.

L'implication de l'hippocampe dans les processus de mémorisation est partie de constats effectués chez des patients atteints de lésions au niveau de cette structure compromettant de manière irréversible leurs capacités mnésiques. Il semble ainsi que l'hippocampe, bien qu'il ne soit pas le siège des souvenirs, joue un rôle critique dans leur formation et plus précisément dans la mémoire des événements, dite mémoire explicite ou déclarative, par opposition à la mémoire de savoir-faire, appelée mémoire implicite ou procédurale, qui dépend d'autres structures du cerveau telles que les ganglions de la base.

X.4. Atrophie hippocampique

Les études cliniques et précliniques prennent en compte l'évolution de la taille de l'hippocampe dans différentes pathologies cérébrales. Chez des patients ayant subi un AVC, l'étude du volume hippocampique total n'établit aucune différence entre ces patients et des patients sains après un examen par IRM effectué 3 et 6 mois après l'événement ischémique. Ces mêmes résultats sont observés que ce soit dans le cadre de la démence vasculaire ou d'un déficit cognitif léger (Sachdev *et al*, 2006). Toutefois, chez des patients ayant subi une ischémie de l'artère cérébrale moyenne, et suivis à 2 et 6 ans, l'IRM a démontré un volume de l'hippocampe inférieur du côté ipsilatéral en comparaison au côté controlatéral (Tang *et al*, 2011 ; Xie *et al*, 2011) tandis que les patients contrôles ne présentent aucune différence (figure 23).

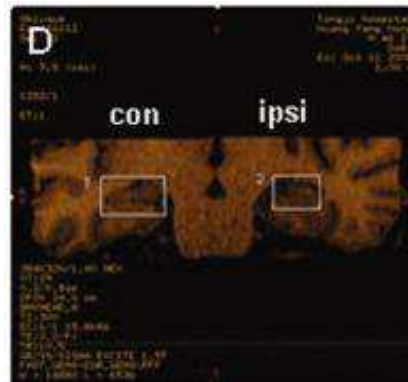


Figure 23 : Imagerie T1 de la zone de l'hippocampe chez un patient ayant subi un AVC touchant l'artère sylvienne. L'hippocampe du côté ipsilatéral a un volume plus petit en comparaison au côté controlatéral (Xie *et al*, 2011).

Cette atrophie hippocampique ne touche pas seulement les patients victimes d'un AVC mais également d'autres pathologies neurodégénératives. En effet, celle-ci se développe chez des patients présentant des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer ou un léger déficit cognitif chez lesquels on retrouve un volume et une épaisseur de l'hippocampe fortement réduits (Sabuncu *et al*, 2011). Chez les patients MCI (souffrant de troubles cognitifs légers), le volume de l'hippocampe gauche est plus petit d'environ 10 % en

comparaison des patients contrôles (Muller *et al*, 2005). Un taux de perte majeure de tissu est observé chez les patients ayant une maladie d'Alzheimer (Sabuncu *et al*, 2011).

Le volume de l'hippocampe peut également prédire l'apparition d'une démence 6 ans après l'examen chez des patients âgés. Ce facteur prédispose à une démence vasculaire ou une démence de type Alzheimer sans déclin cognitif préexistant (Den Heijer *et al*, 2006). Chez les patients souffrant de déficits cognitifs légers, le volume de l'hippocampe gauche est également corrélé de manière positive avec les performances au test du rappel différé (Muller *et al*, 2005). Quant au volume de l'hippocampe droit, chez des patients ayant subi une ischémie cérébrale, plus le volume est élevé, meilleures sont les performances au test visuel du nouvel objet (Sachdev *et al*, 2006).

Un suivi durant 3 ans, révèle que les patients ayant subi un AVC accompagné d'une atrophie du lobe médian temporal, touchant à la fois l'hippocampe et le cortex environnant ont 2 à 3 fois plus de risques de développer une démence. A l'inverse, les patients n'ayant pas d'atrophie du lobe temporal médian développent une démence beaucoup plus tardivement (Cordoliani-Mackowiak *et al*, 2003).

X.5. Atrophies touchant d'autres régions

D'autres zones peuvent être touchées lors de l'ischémie en dehors de l'hippocampe. L'amygdale est une zone qui s'atrophie très précocement après un AVC (de 3 à 6 mois) chez des patients souffrant de troubles cognitifs légers et de démence vasculaire et ce, de manière bilatérale (Sachdev *et al*, 2006). Cette modification de volume permet de prédire au même titre que celle de l'hippocampe l'apparition d'une démence 6 ans après l'examen chez des patients âgés sans déficit cognitif initial (Den Heijer *et al*, 2006).

L'épaisseur du cortex, dans des régions vulnérables, diminue chaque année, chez des sujets sains comme chez des patients ayant la pathologie d'Alzheimer, cependant ce taux d'atrophie par an est bien supérieur dans ce dernier groupe prouvant une accélération du processus de l'atrophie hippocampique (Sabuncu *et al*, 2011).

XI. Lésions cellulaires et moléculaires

Les changements apparus au niveau anatomique sont le signe de profonds changements au niveau cellulaire et moléculaire. Ils peuvent être mis en évidence par différentes approches qui permettent de comprendre les réarrangements qui s'opèrent à cette échelle.

XI.1. Degré de liberté de mouvements des molécules d'eau

La technique IRM a permis de grandes avancées sur les connaissances des processus et en particulier des zones impliquées lors de l'ischémie cérébrale. Dans cette optique, l'étude de l'ADC permet d'être très précis puisqu'il est possible de cibler des zones relativement petites au niveau du cerveau. Chez des patients souffrant de troubles cognitifs légers, ce facteur est plus élevé au sein de l'hippocampe de manière bilatérale traduisant une densité tissulaire moindre au sein de cette région en comparaison aux patients contrôles (Muller *et al*, 2005).

XI.2. Modifications cellulaires au sein de l'hippocampe

Après avoir établi la mise en place de l'atrophie hippocampique, plusieurs études ont démontré des désordres cellulaires au sein de cette région. Après avoir observé des modifications de densité par le biais de la vitesse de diffusion, restent à savoir quels sont au niveau cellulaire les mécanismes sous-jacents. Chez l'homme, une étude très récente a permis de mettre en évidence une densité neuronale plus faible dans la région CA1 de l'hippocampe dans différents cas de démence (AVC non déments, vasculaire, mixte, Alzheimer) en comparaison des patients contrôles. En revanche, aucune différence de densité neuronale n'est observée entre ces groupes pour les régions CA2 et la couche V du cortex entorhinal (ECV) (Gemmell *et al*, 2012). Plusieurs corrélations peuvent être établies entre la densité cellulaire dans ces zones étudiées et les performances cognitives chez les patients ayant subi un AVC, devenus déments ou non (Gemmell *et al*, 2012). Plus l'hippocampe est endommagé par l'atrophie, plus le score MMSE est faible démontrant le déclin cognitif (Tang *et al*, 2011).

L'étude du volume neuronal dans ces mêmes régions a révélé des différences. Dans le cadre de la démence de type Alzheimer et mixte, les régions CA1, CA2 et ECV voient leur volume neuronal diminué de manière bilatérale. Lors d'une démence vasculaire, seules les régions CA1 et CA2 sont touchées par cette observation. La démence post-AVC s'accompagne uniquement d'une diminution du volume neuronal dans la région CA2 unilatéralement (Gemmell *et al*, 2012).

Une fois les régions impliquées identifiées, il convient de comprendre les mécanismes engagés au cours du temps. Grâce à la technique de spectroscopie par IRM et à l'étude des ratios de protéines en comparaison à la créatinine (dont la concentration est stable au sein du tissu cérébral), il est possible d'identifier le type de cellules impliquées dans les phénomènes suivant l'ischémie. Le N-acétylaspartate est exprimé majoritairement au sein des neurones. Chez les patients ayant subi un AVC, l'étude à 2 et 6 ans après le premier événement ischémique met en évidence une perte neuronale caractérisée par un

ratio N-acétylaspartate/créatinine diminué dans l'hippocampe ipsilatéral. Le ratio myoinositol/créatinine (le myoinositol est un marqueur inflammatoire) est augmenté dans l'hippocampe ipsilatéral signe d'une activation inflammatoire en réponse à l'ischémie (Tang *et al*, 2011 ; Xie *et al*, 2011).

XI.3. Cascade neurodégénérative

Dans la maladie d'Alzheimer, des lésions neuropathologiques spécifiques ont été décrites telles que des amas neurofibrillaires dus à une hyperphosphorylation de la protéine tau, la production anormalement élevée de protéine β -amyloïde ($A\beta$ 1-40 et $A\beta$ 1-42) suite au clivage par des enzymes, les sécrétases, d'une protéine précurseur APP « Amyloid Precursor Protein » (figure 24). Les dépôts $A\beta$ résultent de l'agrégation extracellulaire du peptide $A\beta$ sous forme de filaments qui sont diffus et se distribuent de manière variable dans l'ensemble des régions corticales et sous-corticales. Ces lésions sont devenues des marqueurs spécifiques de la pathologie, révélatrices de la neurodégénérescence et de l'apparition à plus ou moins long terme de signes de démence.

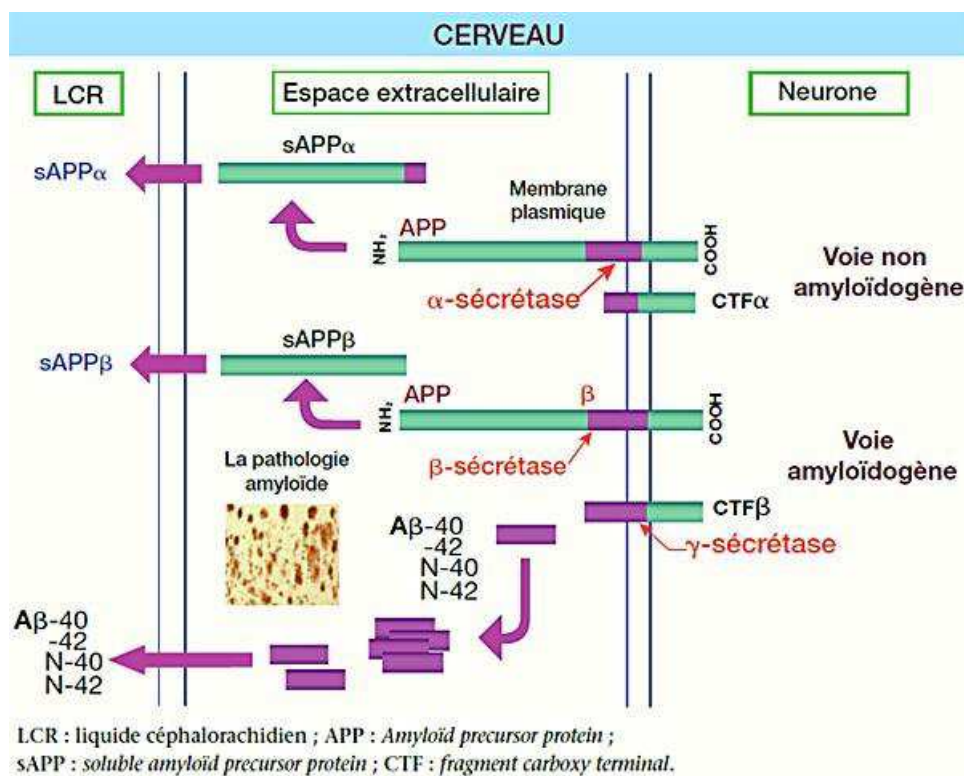


Figure 24 : Schéma du clivage de l'APP

Les recherches, aujourd'hui, établissent une étroite relation entre maladie d'Alzheimer et AVC puisqu'il semble que la présence d'une pathologie accélère la survenue de l'autre et réciproquement. Les hippocampes de patients décédés d'un AVC montrent une expression des formes d' $A\beta$ 1-40 et 1-42 augmentée au sein des neurones. L'expression du

peptide A β 1-40 dans les régions CA1 et CA3 augmente dès 2 heures après l'ischémie et croît pour atteindre une expression maximale 4 jours après la reperfusion. Le peptide A β 1-42 est exprimé dans les régions CA1 et CA3 également 2 heures après l'ischémie, avec un pic d'expression atteint 2 jours après la reperfusion (Qi *et al*, 2007). Toutefois, les études sont encore rares au stade clinique et les avancées actuelles ont plus souvent été apportées par les études précliniques.

XI.4. Métabolisme

Les patients atteints de démence vasculaire, ont une activité acétylcholine estérase réduite d'environ 34,4 % dans le plasma. Cette observation semble être en lien avec les déficits cognitifs observés puisque, plus l'activité de l'acétylcholine estérase est élevée, plus le score au test du MMSE est élevé (Xiao *et al*, 2012). L'étude de cette activité peut se révéler pertinente puisqu'un dérèglement de cette activité enzymatique est à l'origine de la maladie d'Alzheimer et participerait à l'apparition du déclin cognitif dans cette pathologie (Craig *et al*, 2011)

XII. Réparation et régénération

Dans les jours qui suivent l'ischémie-reperfusion, des phénomènes cellulaires et moléculaires se mettent progressivement en place afin de restaurer une partie des pertes neuronales. Au décours du temps, les patients ayant subi un AVC recouvrent une partie de leurs facultés motrices et cognitives malgré des déficits importants le jour de la survenue. Les études ont permis de comprendre les prémices des réarrangements cellulaires et moléculaires se déroulant au sein du tissu cérébral ouvrant la voie à de nouvelles options thérapeutiques.

Le constat de processus réparateurs a pris naissance de l'observation d'une récupération spontanée des patients atteints d'AVC observés dans les semaines voir les premiers mois suivant l'événement. Les recherches se sont principalement intéressées à la fonction motrice, celle-ci étant plus rapidement affectée par l'AVC en comparaison aux fonctions cognitives. Les patients présentant des déficits modérés récupèrent leurs fonctions plus rapidement (dans les 30 jours suivant l'épisode) tandis que les patients atteints de déficits sévères vont récupérer la majorité de leurs fonctions dans une fenêtre allant jusqu'à 90 jours. Toutefois, les fonctions des membres supérieurs et inférieurs sont indifféremment récupérées dans la même fenêtre thérapeutique (Duncan *et al*, 1994). D'autres travaux portant sur la récupération d'une aphasie ou d'une négligence témoignent également d'une cinétique de récupération dans les 3 mois suivant l'épisode ischémique (Pedersen *et al*, 1995 ; Cassidy *et al*, 1998). En revanche, peu d'études portent sur la récupération cognitive après la survenue de l'AVC.

Ces observations cliniques sont toutefois insuffisantes pour déterminer de nouvelles approches thérapeutiques. C'est pourquoi il convient de pousser plus loin les investigations afin de déterminer les mécanismes cellulaires et moléculaires expliquant cette récupération spontanée dans le but de mettre au point de nouvelles approches thérapeutiques.

Chez l'homme, les investigations sont plus difficiles à mettre en œuvre, quelques données ont été collectées par l'exploitation de l'imagerie. Lors d'un AVC, les zones lésées touchant le cortex et la substance blanche c'est-à-dire les fonctions corticales sont affectées. En revanche, en pourtour de cette lésion, une activité altérée mais néanmoins présente est mise en évidence par des études d'IRM fonctionnelles.

A distance du site initial affecté, de nombreux mécanismes compensateurs se mettent progressivement en place. Dans le cas où l'infarctus est mineur, les processus de réparation n'auront lieu qu'au sein de l'hémisphère ipsilatéral. En revanche, si le territoire infarcté est majeur, les réarrangements cellulaires et moléculaires s'opèrent de manière bilatérale (Ward, 2005). Parmi cette réorganisation, (i) une activité croissante s'observe dans les régions initialement connectées avec la zone lésée, (ii) une augmentation de l'activité est également observée au niveau de l'hémisphère controlatéral dans les zones équivalentes aux régions lésées déséquilibrant la latéralisation inter-hémisphérique, (iii) un transfert des connexions s'opère vers des zones non lésées.

Les réarrangements s'opérant au sein de régions connectées avec la lésion initiale touchent des régions impliquées dans les fonctions motrices, visuelles ainsi que dans le langage et l'attention.

L'augmentation croissante de l'activité au sein de l'hémisphère controlatéral est également observée dans d'autres pathologies neuro-dégénératives. Les mécanismes permettant un transfert de la latéralisation inter-hémisphérique font émerger deux hypothèses encore incomplètes à ce jour. La première hypothèse est une augmentation de l'activité au sein de l'hémisphère controlatéral. La deuxième hypothèse est une désinhibition corticale au sein de l'hémisphère non affecté. Cette dernière hypothèse semble prévaloir sur la première. Les études montrent en effet une levée d'inhibition au niveau du cortex primaire mais également au sein des interactions inter-hémisphériques (Shimizu *et al*, 2002 ; Butefisch *et al*, 2008).

La réorganisation des cartes somatotropiques est peu étudiée chez l'homme et principalement au niveau du système moteur. L'étude du cortex moteur commandant la représentation de la main droite montre un transfert de cette représentation au niveau

ventral, postérieur ou dorsal, zones adjacentes à la carte (Jaillard *et al*, 2005 ; Cramer & Crafton, 2006).

Les études précliniques permettent d'approfondir les connaissances dans ce domaine. Des similitudes sont observées entre les rats et les humains, suite à une ischémie cérébrale, des changements de connexions s'opèrent entre le cortex sensori-moteur et la substance blanche profonde (Chouinard *et al*, 2006 ; Van Der Zijden *et al*, 2007). Trois phases de processus réparateurs ont pu être distinguées : en premier lieu, apparaît l'activation de la réparation cellulaire, puis survient la plasticité cérébrale avec la différenciation de voies neuronales existantes et enfin la plasticité liée à la neurogenèse menant à de nouvelles connexions (Wieloch & Nikolich, 2006) (figure 25). Ces trois phases sont le reflet d'activation de différentes classes de gènes jouant un rôle dans la synthèse de facteurs de croissance.

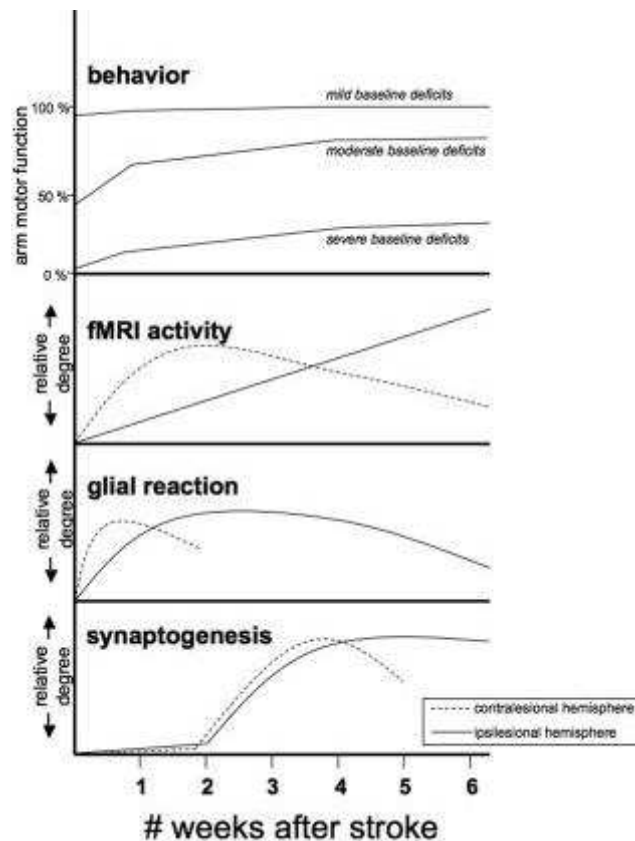


Figure 25 : Schéma de la cinétique des mécanismes spontanés s'opérant après un AVC (Cramer, 2008)

Dans les semaines qui suivent un événement ischémique, des facteurs de croissance sont synthétisés et excrétés, afin de pouvoir agir sur la plasticité neuronale ou encore sur la néogenèse cellulaire. Ces facteurs de croissance sont synthétisés par les neurones en souffrance et les cellules parenchymales prolifératives et vont permettre de guider l'arborisation dendritique, et la guidance axonale. Des réarrangements axonaux

s'opèrent entre les régions adjacentes à la lésion et les zones innervées à l'origine par la lésion pour connecter de nouvelles zones et prendre le relais de la région lésée (Dancause *et al*, 2005). En revanche, à distance de la zone lésée, de nouveaux faisceaux cortico-spinaux permettent d'établir une innervation des régions plus éloignées.

La région subventriculaire est connue pour être le siège de la neurogenèse. Les neuroblastes synthétisés dans cette zone vont sécréter du MMP-2 qui leur permet de dégrader la matrice extracellulaire afin de pouvoir progresser à travers le tissu et migrer, grâce aux facteurs de croissance excrétés par le milieu environnant, jusqu'à leur lieu de différenciation (Lee *et al*, 2006). Cette neurogenèse à partir de cellules souches s'opère durant 4 mois après l'ischémie (Thored *et al*, 2006). En parallèle, la gliose fait son apparition au décours de l'AVC, l'expression de la GFAP « Glial Fibrillary Acid Protein » et de la vimentine s'étendent de la zone subventriculaire jusqu'à la zone péri-lésionnelle (Rickhag *et al*, 2006).

A 1 mois de post-ischémie, plusieurs gènes sont activés afin de permettre les processus de réparation. Parmi ceux-ci, 3 sont actifs depuis les premières 24 heures, notamment les gènes GAP-43 « Growth-Associated Protein-43 » et CAP-23 « Cytoskeleton-Associated Protein-23 », tous deux liés à la croissance axonale. Par ailleurs, d'autres gènes s'activent secondairement à l'ischémie, notamment les gènes SCG10 « Superior Cervical Ganglion-10 » et SCLIP « SCG-10 Like Protein », codant pour les mêmes protéines et intervenant dans la neurogenèse périphérique. Leur expression tardive au sein du système nerveux central reflète des mécanismes différents au sein de ces deux composantes (Carmichael *et al*, 2005) (figure 26).

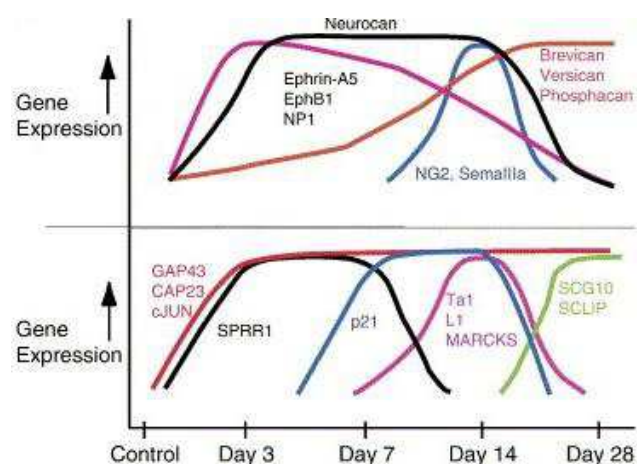


Figure 26 : Cinétique d'activation des gènes impliqués dans les processus de croissance suite à un AVC (Carmichael *et al*, 2005).

XIII. Modèles animaux

Le rat est l'animal privilégié car son anatomie vasculaire est très comparable à celle de l'homme (Yamori *et al*, 1976) (figure 27).

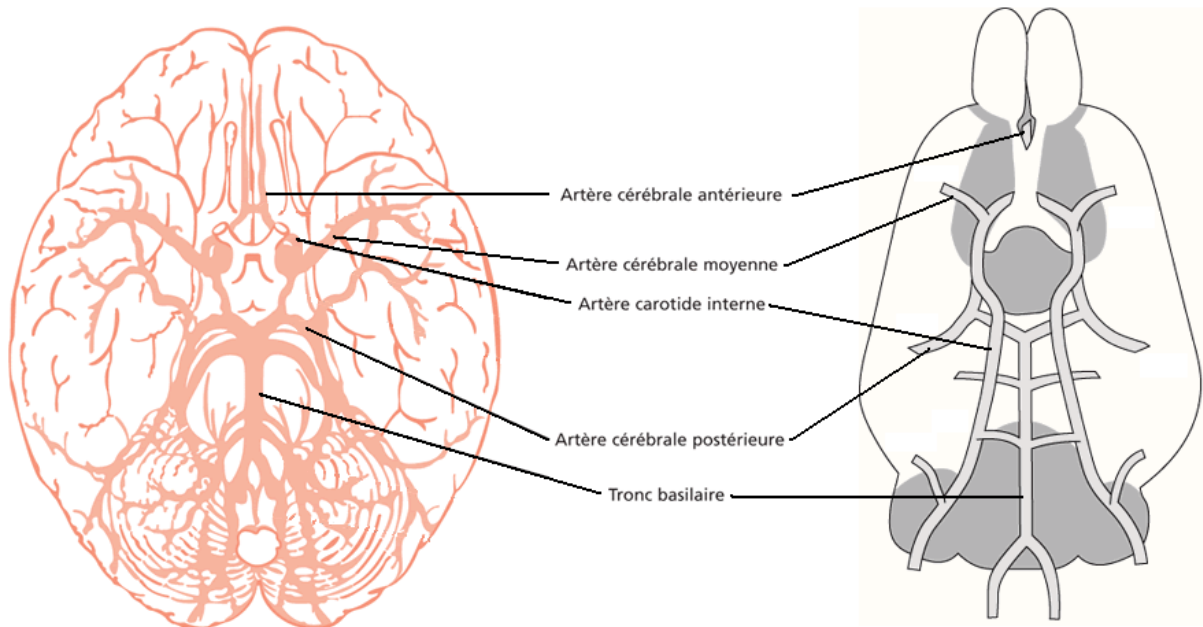


Figure 27 : Anatomies comparées de la vascularisation cérébrale chez le rat et chez l'Homme.

De nombreux modèles ont été mis au point au fur et à mesure de l'avancée des recherches permettant l'étude des conséquences tant d'un point de vue histopathologique, que d'un point de vue fonctionnel ou d'imagerie.

Plusieurs critères doivent être réunis afin de pouvoir définir un bon modèle d'étude de l'AVC. Le processus d'induction de l'ischémie et ses conséquences doivent se rapprocher de ce qui se produit chez l'homme. La taille de l'infarctus doit être reproductible, la technique employée afin d'induire l'ischémie cérébrale doit être facile à reproduire et se doit d'être la moins invasive possible. Les constantes physiologiques doivent pouvoir être monitorées et régulées si besoin, les échantillons cérébraux doivent pouvoir être facilement recueillis afin de permettre les analyses ultérieures et enfin les coûts doivent être réduits. Il existe notamment deux grands types de modèles, à savoir les modèles avec ou sans craniotomie. Ces derniers étant les plus couramment utilisés puisqu'étant les moins invasifs sur l'animal (Durukan & Tatlisumak, 2007).

XIII.1. Modèle thrombo-embolique

Ce modèle est le plus proche d'un point de vue physiologique puisqu'il reproduit un mécanisme d'ischémie couramment retrouvé chez l'humain. Dans un premier temps, des fragments de thrombus humains étaient injectés via les artères extra-crâniâles afin

d'atteindre l'extrémité distale des artères intra-craniâles (figure 28). Cependant, les premiers travaux ont montré une reperfusion précoce dans ce type de modèle ce que ne permet pas l'utilisation de traitements thrombolytiques. De plus, le placement du thrombus au sein des artères était peu reproductible ce qui empêchait une bonne étude (Kaneko *et al*, 1985).

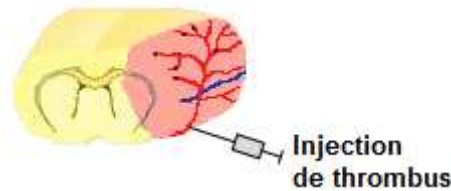


Figure 28 : Modèle thrombo-embolique

Pour pallier à ces inconvénients, des modèles plus récents emploient l'utilisation de thrombus enrichi en fibrine, une étude de 1997 a démontré l'efficacité de ce modèle sur la réduction du débit sanguin cérébral ainsi que l'induction d'un infarctus dans la région de l'artère cérébrale moyenne, sans reperfusion spontanée (Busch *et al*, 1997). Aujourd'hui il n'existe pas de modèle thrombo-embolique standardisé, néanmoins, les études ont montré l'importance de la nature du thrombus dans la réduction du débit sanguin cérébral provoquant ainsi des lésions reproductibles au niveau du territoire de l'artère cérébrale moyenne.

Beaucoup plus récemment, une variante à ce type d'induction a été mise au point avec l'utilisation de matériaux emboliques artificiels, tels que le silicone (Lauer *et al*, 2002), le collagène (Purdy *et al*, 1989) ou encore des athéroembolies hétérologues (Rapp *et al*, 2003), injectés via l'artère carotide commune ou interne. Ces études sont effectuées en première intention chez les rats puis chez des mammifères plus évolués.

XIII.2. Modèle photo-thrombotique

Ce modèle décrit pour la première fois en 1985 est devenu aujourd'hui un modèle pertinent d'étude. Au préalable, un colorant sensible à la lumière est injecté (dans la plupart des cas, du rose bengale) au niveau de la zone à infarctir (Watson *et al*, 1985) (figure 29).

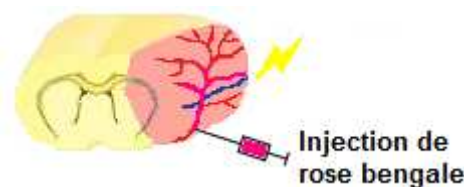


Figure 29 : Modèle photo-thrombotique

Sous l'effet d'une irradiation à une longueur d'onde déterminée, des molécules d'oxygène vont se former provoquant des micro-lésions très focalisées au niveau de la zone

irradiée avec apparition concomitante d'une rupture de la BHE et d'un œdème vasogénique (Dietrich *et al*, 1987).

Cependant, les lésions induites ne sont pas caractéristiques de la pénombre présente au niveau d'un infarctus humain. Plus récemment et dans le but de corriger cette lacune du modèle, des essais ont été réalisés en modifiant les longueurs d'onde employées ainsi que le temps d'irradiation, ce qui a permis d'induire des lésions corticales ayant les propriétés de la zone de pénombre. Ce modèle induit une ischémie permanente au niveau du vaisseau, empêchant l'étude de la reperfusion au niveau de la zone infarctée. C'est pourquoi ce modèle est plus couramment employé pour étudier la régénération de post-ischémie.

XIII.3. Modèle d'injection d'endothéline-1

L'endothéline-1 est un puissant vasoconstricteur pouvant être appliqué au contact de la zone à infarctir, notamment la zone de l'artère cérébrale moyenne à l'aide d'une injection stéréotaxique (Sharkey *et al*, 1993). Les résultats ont montré une réduction significative du débit sanguin cérébral dans cette zone (figure 30).

Cette technique, peu invasive, entraîne néanmoins un développement astrocytaire important ainsi qu'une régénération spontanée au niveau des axones interférant ainsi avec les études pouvant porter sur la régénération apportée par la pharmacologie (Carmichael, 2005).

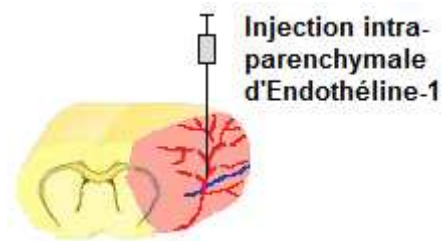


Figure 30 : Modèle d'injection d'endothéline-1

XIII.4. Modèle de l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne

Ce modèle consiste à introduire un fil de suture qui va venir bloquer l'ostium de l'artère cérébrale moyenne et donc la circulation sanguine dans le territoire irrigué par celle-ci, à savoir le cortex frontopariétal et le striatum. Il est le plus fréquemment utilisé aujourd'hui puisqu'il est peu invasif, très facilement reproductible et de plus, il permet d'effectuer une occlusion permanente ou transitoire en retirant le fil de suture. L'infarctus maximal est atteint à 24 heures et il permet d'étudier des stratégies neuroprotectives. Koizumi *et al* fut la première équipe à mettre au point ce modèle en 1986 et depuis, de nombreuses

améliorations y ont été apportées. La reproductibilité de la lésion peut être modulée par différents facteurs, notamment l'épaisseur du fil de suture, sa nature, ou sa longueur d'insertion (Longa *et al*, 1989) (figure 31).

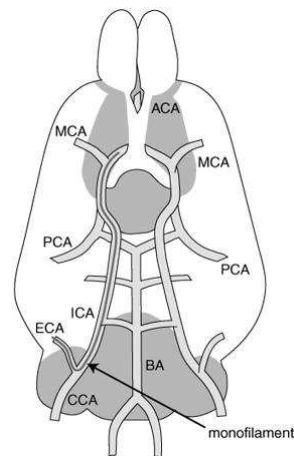


Figure 31 : Modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne

L'espèce la plus couramment utilisée est le rat cependant, ce modèle a été adapté chez le lapin ou la souris avec l'avantage indéniable de pouvoir utiliser des modèles transgéniques chez cette dernière.

Cependant, comme tout modèle, il présente des inconvénients tels qu'une rupture des vaisseaux entraînant ainsi une hémorragie sous-arachnoïdienne, une hyperthermie en particulier lorsque l'ischémie dure plus de 2 heures (Li *et al*, 1999) et enfin un échec de la technique d'occlusion.

XIII.5. Modèles avec craniotomie

Certains modèles d'ischémie cérébrale focale requérant une craniotomie sont particulièrement invasifs et peuvent exposer le cerveau à l'atmosphère extérieure, affecter la pression intra-crânienne ainsi qu'une dysfonction de la BHE. Le modèle le plus couramment utilisé consiste en une ischémie de l'artère cérébrale moyenne. Pour cela, une électrocoagulation peut être effectuée directement sur cette artère, ou via l'utilisation de microclips (Tamura *et al*, 1981). Par ailleurs, il existe également le modèle dit de l'occlusion des trois artères, qui consiste en une électrocoagulation de l'artère cérébrale moyenne et en parallèle à cette occlusion, une réduction drastique du débit sanguin cérébral par l'occlusion uni ou bilatérale de la carotide commune mais il entraîne un taux de mortalité important (Buchan *et al*, 1992). Ce modèle est couramment employé dans les études portant sur l'ischémie-reperfusion chez le raton nouveau-né. Toutefois, il est nécessaire d'avoir une occlusion bilatérale des carotides communes afin d'obtenir un taux de rats lésés supérieur. Les collatérales du système vasculaire du nouveau-né permettent de suppléer le flux

sanguin et une augmentation de la vitesse du débit sanguin est également observée dans le tronc basilaire ce qui réduit le taux d'animaux lésés (Bonnin *et al*, 2011).

XIII.6. Modèles par les artères cérébrales postérieures

Les artères les plus fréquemment visées par ce modèle sont les artères basilaires afin de reproduire les AVC vertébro-basilaires qui vont notamment affecter le cervelet ou encore le tronc cérébral. Cependant, ce modèle n'est pas le plus pertinent puisqu'il provoque des infarctus de petite taille avec très peu de déficits neurologiques (Kameyama *et al*, 1985). Plus récemment, il a été amélioré par l'injection de caillots via les artères vertébrales couplée à la thermocoagulation des artères basilaires.

XIII.7. Modèle de thrombose veineuse

Ce modèle est très peu étudié puisqu'une ischémie veineuse est relativement rare dans l'étiologie des AVC. Le modèle le plus couramment utilisé est celui de l'occlusion des deux veines corticales par la technique de la photothrombose (Frerichs *et al*, 1994) (figure 32).

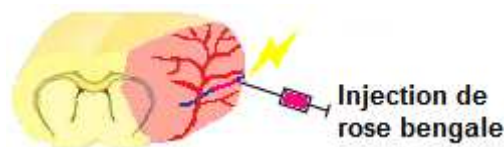


Figure 32 : Modèle de thrombose veineuse

XIV. Etudes précliniques

Les travaux effectués chez les patients ont permis de récolter de nombreuses données sur le devenir fonctionnel et mnésique au décours d'un AVC. Les modèles animaux précédemment décrits se rapprochent de la pathologie clinique, et permettent par conséquent d'appréhender les mécanismes physiopathologiques en parallèle avec les observations cliniques.

XIV.1. Conséquences fonctionnelles

Afin de permettre une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents, un travail doit être effectué en amont ou en parallèle sur les animaux pour reproduire et décrire les effets de l'ischémie à long terme. Grâce à l'étendue de la gamme de tests comportementaux, de nombreux aspects fonctionnels et mnésiques peuvent aujourd'hui être étudiés (Freret *et al*, 2011).

XIV.1.1. Déficit fonctionnel

Dès 24 heures de reperfusion, les études comportementales permettent d'effectuer un suivi. En parallèle avec le mRS, le score neurologique, de par sa facilité d'application reste encore largement employé aujourd'hui car il permet d'avoir une chronologie de l'évolution de ce score au décours d'une ischémie-reperfusion. Toutefois, les items varient quelque peu selon les études. Plus largement employé, le score de Bederson permet de mesurer l'état général de l'animal (Bederson *et al*, 1986). Chez un animal ischémié, 24 heures suivant la reperfusion, le score de Bederson est moyenné à 2,5 chez des animaux non traités (Kraft *et al*, 2010 ; Crumrine *et al*, 2011) reflétant un déficit modéré accompagné d'une faiblesse du côté controlatéral à la lésion. Le test de préhension qui permet d'étudier les réactions tactiles et proprioceptives ainsi que le tonus musculaire met en évidence un déficit modéré dans plusieurs travaux effectués dans un modèle transitoire d'ischémie cérébrale allant de valeurs proches de 0 (Plaisier *et al*, 2008b) à une valeur de 2 (Kraft *et al*, 2010) reflétant une atteinte motrice sévère à 24 heures. La coordination motrice et l'équilibre, étudiés à l'aide du rotarod mettent en évidence un déficit de l'animal déterminé par rapport aux performances des rats avant opération. Une diminution de 65 % du temps passé sur le rotarod à suivre le rythme imposé est observée (Plaisier *et al* ; données non publiées). La fonction somato-sensitive et motrice, mise en évidence par le test du ruban adhésif montre chez des rongeurs ischémiés un déficit évalué à 0,5 reflétant l'occultation et l'inaptitude à retirer les morceaux d'adhésifs des pattes avant à 24 heures de reperfusion (Plaisier *et al*, 2008b). Le test du placement des pattes, permet d'observer les facultés sensori-motrices et proprioceptives de l'animal. Celui-ci consiste à scorer le placement des pattes avant et des pattes arrière lors de stimulations tactiles. En post-ischémie, un déficit au niveau des pattes avant et des pattes arrière est observé dès le lendemain de l'opération (Roof *et al*, 2001).

Dès 24 heures de reperfusion, plusieurs aspects fonctionnels sont déjà affectés tels que les aptitudes proprioceptives, sensori-motrices, somato-sensitives, la coordination motrice et l'équilibre. Il convient donc d'étudier les récupérations qui peuvent s'opérer par la suite. Une semaine après l'ischémie, la récupération est présente au niveau des fonctions proprioceptives, somato-sensitives et somato-motrices, en revanche, d'autres déficits apparaissent tels que l'asymétrie d'utilisation de la patte avant par le biais du test du cylindre. 1 mois après l'opération, lors de la phase de consolidation, les changements s'opérant au niveau fonctionnel sont encore plus importants, témoignant d'une période charnière.

A 3 jours de reperfusion, le score neurologique reflète encore un déficit modéré (Van der Zijden *et al*, 2008a) mais une récupération progressive est visible dès 7 jours de reperfusion (Karki *et al*, 2010). Progressivement, une absence de séquelles (Freret *et al*,

2006) ou un léger déficit (Virley *et al*, 2000 ; Van der Zijden *et al*, 2008a) en comparaison des rats sham perdurent entre 1 et 2 mois de post-ischémie. Ce déficit persiste jusqu'à 1 an de post-ischémie sur des rats ischémiés-reperfusés (Karki *et al*, 2010).

Le rotarod (figure 33) démontre encore un déficit majeur à 3 jours de reperfusion avec 55 à 60 % de perte comparée au conditionnement et une récupération progressive à partir du 4^{ème} jour de post-ischémie (Bouet *et al*, 2007 ; Plaisier *et al*, données non publiées). En revanche, cette coordination motrice et cet équilibre ne sont plus affectés à 6 mois après un arrêt cardiaque puisque ce test ne démontre plus aucune différence entre les groupes. A 18 mois de post-ischémie, il apparaît une diminution du temps passé sur le rotarod par les deux groupes de rats probablement en raison de leur vieillissement (Kiryk *et al*, 2011).

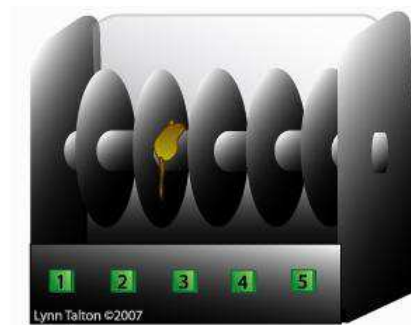


Figure 33 : Schéma du rotarod

En parallèle à ce test, le suivi des animaux par le test de préhension montre une récupération progressive bien qu'incomplète de cette fonction motrice de 3 à 7 jours de reperfusion (Plaisier *et al*, 2008b). En ce qui concerne la locomotion, le test de marche sur les barreaux est employé à plus long terme car il nécessite une récupération de la part de l'animal. Pour cela, le rat doit parcourir une plate-forme sur une distance de 100 cm sur des barreaux placés à 1 m de hauteur afin de rejoindre un compartiment dans un délai imparti. Les résultats mettent en évidence une récupération dès 1 mois de post-ischémie chez les rats ischémiés (Virley *et al*, 2000).

Par ailleurs, une asymétrie mesurable par le test du cylindre, peut apparaître dans l'utilisation des pattes avant. Dans un modèle d'occlusion permanente de l'ACM, la patte ipsilatérale est plus souvent utilisée afin d'explorer le mur et retomber sur ses pattes au détriment de la patte controlatérale de 7 jours à 1 mois de post-ischémie. Les animaux sham ne manifestent aucune préférence à utiliser l'une ou l'autre des pattes avant (Roof *et al*, 2001). Les propriétés sensori-motrices et les habiletés proprioceptives, par le biais du test du placement des pattes montre un déficit des quatre pattes qui perdure jusqu'à 1 mois de post-ischémie (Roof *et al*, 2001). En revanche, une autre étude met en évidence une récupération fonctionnelle de la patte arrière controlatérale à 1 mois de post-ischémie, tandis que le déficit

existant au niveau de la patte avant controlatérale perdue au-delà de 2 mois de post-ischémie (Freret *et al*, 2006). De même, le test du glissement des pattes sur une roue en rotation permet de calculer un indice qui va refléter les erreurs commises (les glissements) et ce test met en évidence un déficit chez des rats ischémiés de 7 à 12 mois de post-ischémie au niveau de la patte controlatérale (Karhunen *et al*, 2003).

Cependant, ces tests ne permettent pas d'apprécier des déficits plus fins. Les fonctions somato-sensitives et motrices sont étudiées par le test du ruban adhésif qui permet un suivi à très long terme en modulant la taille des morceaux d'adhésif à retirer (figure 34). Plus le morceau est de petite taille, plus le déficit observé sera finement détecté. Ce test met en évidence à 3 jours de reperfusion, une tendance à récupérer (Plaisier *et al*, 2008b) se confirmant à 7 jours de reperfusion, par un succès à retirer le morceau d'adhésif ipsilatéral à la lésion mais un échec à retirer du côté controlatéral malgré les efforts tentés par l'animal (Bouet *et al*, 2007 ; Plaisier *et al*, 2008b). A distance de l'opération, ce test met en évidence un déficit de la patte controlatérale des rats ischémiés se traduisant par un temps supérieur et des échecs répétés à retirer le morceau d'adhésif à 1 mois de post-ischémie (Virley *et al*, 2000 ; Freret *et al*, 2006), 2 mois de post-ischémie tandis que la patte ipsilatérale a récupéré (Freret *et al*, 2006) et perdurant jusque 1 an de post-ischémie (Karki *et al*, 2010) démontrant une perturbation irréversible des fonctions somato-sensitives et motrices au décours d'une ischémie-reperfusion.



Figure 34 : Test de retrait de l'adhésif (Park *et al*, 2010)

Le test de l'escalier est très discriminant pour observer les déficits de la dextérité et de l'habileté des pattes avant, néanmoins il nécessite un conditionnement ainsi qu'une restriction alimentaire. Dans un modèle transitoire d'ischémie focale à 1 mois de post-ischémie, un déficit est présent chez les rats ischémiés ce qui restreint leurs capacités à récupérer les granulés avec chacune des pattes avant, avec cependant, un déficit plus modéré de la patte ipsilatérale (Virley *et al*, 2000). Ces difficultés perdurent jusqu'à 2 mois après la reperfusion. En revanche, plus aucun déficit n'est observé quant à la patte ipsilatérale (Freret *et al*, 2006).

En conclusion, les capacités fonctionnelles des rats sont perturbées au décours d'une ischémie cérébrale, avec une récupération variable au cours du temps en fonction de la difficulté de la tâche à accomplir.

XIV.1.2. Déficit cognitif

Chez l'animal, les études se heurtent à court terme à la difficulté des rongeurs à récupérer leurs capacités à se mouvoir lorsque les ischémies sont globales. Ceci pouvant expliquer la rareté des études précliniques portant sur les tests mnésiques. En revanche, certaines études se sont intéressées au devenir à long terme dans des modèles d'ischémie-reperfusion.

La mémoire de reconnaissance d'un nouvel objet ne semble pas altérée à long terme après l'ischémie. Dans une étude effectuée dans un modèle d'arrêt cardiaque et visant à étudier les troubles de la mémoire consécutifs à cette opération, le test de la reconnaissance d'un nouvel objet ne met pas en évidence de trouble mnésique chez les rats resuscités par rapport aux rats sham à 6 et 18 mois après l'induction de l'arrêt cardiaque (Kiryk *et al*, 2011).

La mémoire de travail subit des perturbations au décours d'une ischémie-reperfusion. A 1 mois de post-ischémie, aucun déficit n'est perçu (Langdon *et al*, 2008). En revanche, à partir de 2 mois de post-ischémie, le test du labyrinthe en T pour lequel le rat doit effectuer des choix corrects met en évidence un besoin d'augmenter le nombre d'essais pour obtenir les choix corrects dans le groupe de rats ranimés dans un modèle d'ischémie globale (Langdon *et al*, 2008) (figure 35).

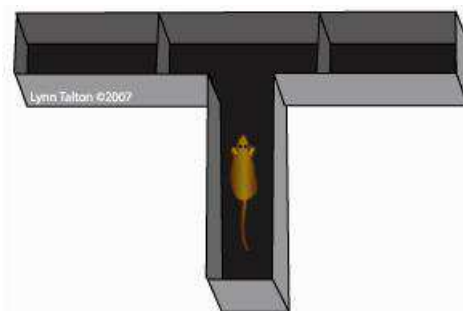


Figure 35 : Schéma du labyrinthe en T

Ce déficit perdure jusqu'à 5 mois de post-ischémie et est mis en évidence par un test plus sensible, le test du labyrinthe en étoile à 8 bras où les rats ischémisés ont besoin d'un apprentissage plus long pour atteindre le critère sélectionné et éviter les visites successives dans un bras déjà visité (Langdon *et al*, 2008 ; Nishio *et al*, 2010) (figure 36).

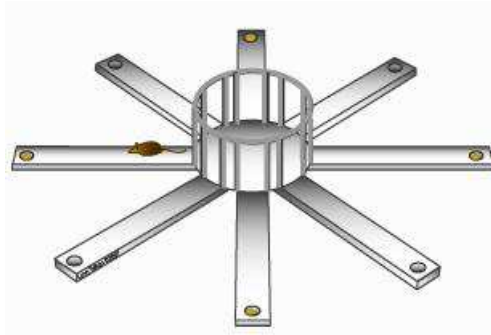


Figure 36 : Schéma du test du labyrinthe en radial

La mémoire à long terme, mise en évidence par l'évitement passif, est altérée dès 9 jours de reperfusion et jusqu'à à 14 jours de reperfusion. Le temps de rétention est réduit lors de la phase de test chez les animaux ischémiés en comparaison aux rats sham (Bouet *et al*, 2007 ; Li *et al*, 2007 ; Zhang *et al*, 2010 ; Li *et al*, 2011). A 1 mois de post-ischémie, ce déficit est toujours présent dans un modèle d'hypoxie chez des ratons nouveau-nés (Karalis *et al*, 2011).

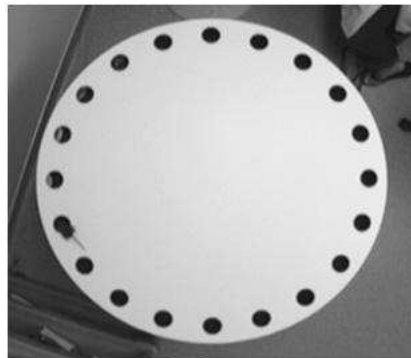


Figure 37 : Photo du labyrinthe de Barnes

De nombreuses études ont mis en évidence des altérations de la mémoire de référence spatiale après la survenue d'une ischémie. A court terme, les résultats de l'apprentissage montrent des résultats contrastés selon les études. Deux études débutant respectivement à 10 et 15 jours suivant la reperfusion ischémique, ne démontrent aucun déficit entre les groupes qui apprennent la localisation de la plate-forme (Bouet *et al*, 2007 ; Langdon *et al*, 2008). A l'opposé, certaines équipes mettent en évidence un déficit d'apprentissage chez les animaux lésés (Li *et al*, 2007 ; Li *et al*, 2011). Durant la phase de consolidation, les premiers déficits sont perçus dès 2 mois après l'ischémie, par le test de la piscine de Morris, qui démontre des difficultés d'apprentissage ainsi qu'une difficulté de restitution de la tâche lors de la phase de test (nombre de croisements de la plate-forme moindre et une latence diminuée pour atteindre cette plate-forme) (Xiao *et al*, 2011). Ce déficit est observé à 6 mois de post-ischémie par le biais d'un autre test, le labyrinthe de

Barnes, où les animaux ischémiés passent moins de temps autour du trou cible lors de la phase de test malgré un apprentissage correct (Nishio *et al*, 2010) (figure 37).

Ce même déficit est démontré par la piscine de Morris à 6 mois de post-ischémie avec des items variables mais en concordance avec une mémoire altérée chez les animaux ischémiés (Langdon *et al*, 2008 ; Kiryk *et al*, 2011), puis à 7 mois de post-ischémie (Karhunen *et al*, 2003). Ces résultats diffèrent quelque peu à 12 mois de post-ischémie, l'apprentissage est altéré chez les animaux ischémiés alors que la phase de test ne met en évidence aucune différence entre les deux groupes (Karhunen *et al*, 2003). A 18 mois de post-ischémie, aucune différence entre les deux groupes n'est mise en évidence lors du test de la piscine de Morris car les rats sham présentent également des difficultés d'apprentissage (Kiryk *et al*, 2011).

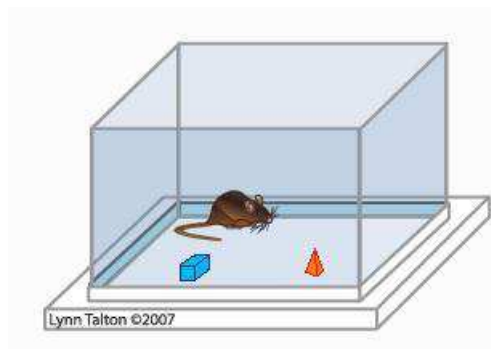


Figure 38 : Schéma du test de la reconnaissance d'objet

En revanche, le test de reconnaissance de place pointe un déficit mnésique des rats ayant subi un arrêt cardiaque comparé avec les rats sham 6 mois après l'opération avec des difficultés à reconnaître la nouvelle place d'un objet dans l'arène. A 18 mois de post-ischémie, les deux groupes ne sont plus capables de discriminer les nouvelles places des objets vraisemblablement en raison de leur vieillissement (Kiryk *et al*, 2011) (figure 38).

Au cours du temps suivant une ischémie cérébrale, plusieurs types de mémoire sont progressivement altérés tels que la mémoire de travail, la mémoire de référence spatiale ou non. En revanche, la mémoire à long terme ne semble pas altérée.

XIV.1.3. Désordre émotionnel

Chez les animaux, les études se font encore rares aujourd'hui. Une étude sur des rats ayant subi un arrêt cardiaque, démontre un nombre d'entrées supérieur dans le labyrinthe surélevé comparé aux rats sham à 6 et 18 mois après l'opération (figure 39). De même, les rats ressuscités ont une tendance à passer plus de temps dans les bras ouverts sur le test du labyrinthe surélevé témoignant d'une anxiété moindre (Kiryk *et al*, 2011).

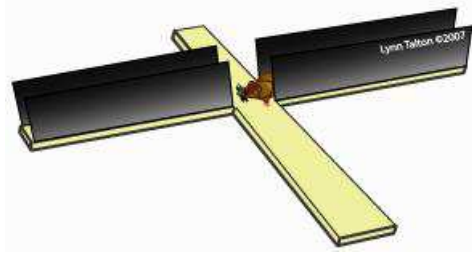


Figure 39 : Schéma du labyrinthe surélevé

XIV.2. Conséquences lésionnelles

XIV.2.1. Evolution des lésions

La technique IRM a permis de grandes avancées sur les connaissances des processus et en particulier des zones impliquées lors de l'ischémie cérébrale. Les études précliniques permettent une meilleure exploitation des résultats d'imagerie. L'étude combinée de deux séquences d'IRM, l'ADC et le signal T2, couplée à l'étude histologique permet de rassembler de nombreuses données.

Plusieurs études chez des animaux ischémiés-reperfusés ont montré un hypersignal en séquence T2, caractéristique de l'infarctus cérébral à 24 heures de reperfusion en comparaison aux rats sham, suivi d'une diminution de la taille de cet hypersignal à 7 jours. Par la suite, la taille de la zone ischémiée se stabilise entre 7 jours et la fin de l'étude fixée à 1 mois (Virley *et al*, 2000) ou 1 an après l'opération (Karki *et al*, 2010).

En parallèle, deux zones sont distinguées en plus de la lésion initiale : une zone initialement touchée qui récupère rapidement au cours de la reperfusion et une zone initialement non touchée où une lésion apparaît secondairement. L'analyse du signal T2 montre un temps de relaxation comparable dans ces trois zones jusqu'à 3 jours de reperfusion. Au-delà, ce signal T2 est comparable à l'hémisphère controlatéral dans la zone qui a recouvré dès une semaine après l'ischémie. Le facteur ADC, reflétant le degré de liberté de mouvements d'eau, est augmenté dans la zone récupérée et un facteur ADC comparable à l'hémisphère controlatéral n'est observé qu'à 1 an de post-ischémie (Van der Zijden *et al*, 2008a). En revanche, le temps de relaxation du signal T2 de la zone touchée secondairement suit la même courbe cinétique que la zone lésionnelle, à savoir une augmentation du temps de relaxation T2 et du facteur ADC jusqu'au 6^{ème} mois de post-ischémie, puis une stabilisation jusque 1 an, témoignant d'un tissu moins dense qui se rapproche du LCR (Karki *et al*, 2010).

Lorsque le temps de relaxation T2 est identique à celui du LCR, cela signe la présence des cavités porencéphaliques caractérisées par une perte de tissu essentiellement

dans les régions corticales et dans le striatum latéral. Ce constat effectué *in vivo* est confirmé par les études histologiques. Dès 1 mois de post-ischémie, ces cavités font leur apparition s'étendant du cortex frontal au cortex pariétal en passant par le noyau caudé (Virley *et al*, 2000). Cependant, selon les modèles étudiés, les dommages tissulaires diffèrent. La perte tissulaire est plus importante dans un modèle permanent d'occlusion puisqu'à la fois le cortex et le noyau caudé dorso-latéral sont touchés alors que dans le modèle transitoire, ne sont touchés que les cortex pariétal et temporal (Roof *et al*, 2001). Dans un modèle d'ischémie transitoire, à 2 mois de post-ischémie, cette perte de tissu est sévère (34 %) dans l'hémisphère ipsilatéral et se décompose comme suit : 49 % de perte corticale et 72 % de perte striatale (Freret *et al*, 2006). A 1 an de post-ischémie, le volume lésionnel représente 27,6 % par rapport à l'hémisphère controlatéral (Karki *et al*, 2010).

Afin de pouvoir prédire à l'avenir les déficits apparaissant au décours de l'ischémie et ainsi pouvoir les anticiper, il est nécessaire d'examiner de possibles corrélations au sein des études précliniques afin de pouvoir les transposer en clinique. Au niveau fonctionnel, une occlusion permanente permet de corréler le volume d'infarctus sous-cortical avec un mauvais placement des pattes avant. Dans un modèle transitoire, plus l'infarctus total est élevé, moins le placement des pattes avant est correct, avec une asymétrie plus prononcée de la patte ipsilatérale (Roof *et al*, 2001). Plus précisément, le volume de tissu perdu au niveau striatal est corrélé à un mauvais score de la patte avant controlatérale jusqu'à 2 mois de post-ischémie. De même, les performances au test de l'adhésif ou le déficit de la patte controlatérale avant lors du test de l'escalier sont très dépendantes de la taille de l'infarctus cortical ou sous-cortical (Freret *et al*, 2006). Au niveau mnésique, dans le modèle d'occlusion permanente, plus l'infarctus sous-cortical est élevé, plus le rat couvrira une distance plus élevée pour retrouver la plate-forme lors du test de la piscine de Morris.

XIV.2.2. Atrophie hippocampique

Les études précliniques s'intéressent aujourd'hui à ce phénomène, cependant, l'utilisation de l'IRM étant encore marginale à ce stade, les études sont encore peu nombreuses pour décrire et exploiter ce paramètre.

Les résultats obtenus dans un modèle d'occlusion transitoire démontrent l'apparition d'une atrophie hippocampique dès 3 mois de post-ischémie (figure 40) et jusqu'à la fin de l'étude à 5 mois de post-ischémie (Xie *et al*, 2011).

Par ailleurs, ces résultats corroborent d'autres travaux histologiques réalisés sur des cerveaux prélevés sur les animaux. Dans un modèle d'occlusion bilatérale des carotides communes, le volume de l'hippocampe est fortement diminué en comparaison des rats sham, 8 mois après l'opération (Nishio *et al*, 2010).

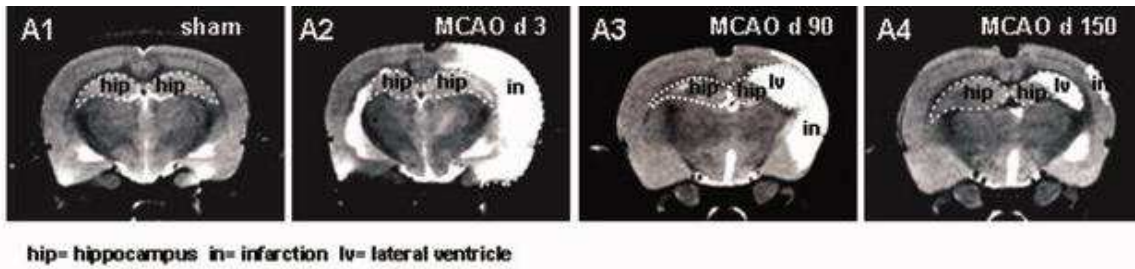


Figure 40 : Imagerie T2 de rats ayant subi une ischémie transitoire par l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne et montrant l'atrophie hippocampique apparaissant au fur et à mesure du temps (Xie *et al*, 2011).

XIV.2.3. Atrophies dans d'autres régions

Dans un modèle d'ischémie transitoire, le volume du thalamus est réduit de 40 % à 1 mois de post-ischémie (Freret *et al*, 2006). En revanche, des zones du cerveau comme le cortex préfrontal ou encore le corps calleux ne sont pas touchés par l'ischémie chez la souris 8 mois après l'opération (Nishio *et al*, 2010).

XV. Lésions cellulaires et moléculaires

Les changements apparus au niveau anatomique sont le signe de profonds changements au niveau cellulaire et moléculaire. Les études au stade préclinique permettent de pousser plus loin les investigations afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à une ischémie-reperfusion.

XV.1. Lésion anatomiques

Dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez le rat, à 1 mois de post-ischémie, au sein de l'hémisphère lésé, le facteur ADC est fortement augmenté dans les zones du noyau caudé dorso-latéral, dans le cortex pariétal inférieur ainsi que dans le cortex de la patte avant, tandis que le facteur ADC des rats sham ne montre aucune différence et est comparable aux valeurs obtenues au sein du côté controlatéral des animaux ischémiés. En revanche, aucune différence n'a été montrée dans la zone du cortex de la patte arrière (Virley *et al*, 2000).

Les études comparatives mettent en évidence une corrélation entre le facteur ADC au sein du cortex pariétal inférieur et le temps de contact et de retrait de l'adhésif pour la patte avant controlatérale. De même, il existe une corrélation entre l'ADC du noyau caudé, du cortex de la patte avant et du cortex pariétal inférieur et les capacités de l'animal à récupérer les granulés à l'aide de ses deux pattes (Virley *et al*, 2000).

La mesure du volume des ventricules latéraux montre une évolution du ratio entre les deux côtés. Il va croître de manière accélérée dans les premières semaines qui suivent

l'ischémie puis plus progressivement dans les mois suivants pour atteindre un ratio de 2,4 à 1 an montrant au décours du temps que le volume du ventricule latéral ipsilatéral augmente signifiant une perte de tissu localisée en pourtour de ce ventricule (Karki *et al*, 2010).

XV.2. Modifications cellulaires au sein de l'hippocampe

L'apparition de l'atrophie hippocampique étant établie, plusieurs études ont démontré des désordres cellulaires au sein de cette région. Après avoir observé des modifications de densité par le biais de la vitesse de diffusion, reste à savoir quels sont au niveau cellulaire les mécanismes dépendants. Les études histologiques retrouvent chez des rats ischémiés-reperfusés un rétrécissement de l'hippocampe ipsilatéral au décours du temps tandis que cette observation n'est pas faite chez les rats sham. Dès le 3^{ème} jour suivant la reperfusion, une perte neuronale au niveau de la région CA1, provoquée par l'induction de l'apoptose (65 % des cellules) apparaît (Xie *et al*, 2011). Chez les rats ischémiés, ces noyaux pycnotiques apparaissent et sont présents au sein des différentes aires de l'hippocampe, (zones CA1, CA2, CA3, CA4 ainsi que la zone du DG) du côté ipsilatéral à 2 mois de post-ischémie. De même, la coloration de Nissl moins intense dans cette région est le signe d'une perte de substance (cytoplasme, organites au sein de la cellule) (Xiao *et al*, 2011) ce qui a été retrouvé dans un modèle préclinique d'arrêt cardiaque, au niveau de la région CA1 de l'hippocampe (Kiryk *et al*, 2011). Plus précisément, un comptage dans ces zones révèle une densité neuronale moindre dans les zones CA1, CA2 et CA3 de l'hippocampe ipsilatéral. En revanche, il n'y a pas de différence pour la région du DG (Xiao *et al*, 2011). Une seule étude à long terme réalisée chez la souris montre, 8 mois après l'opération, de nombreux noyaux pycnotiques au sein du cortex cérébral et de l'hippocampe qui s'accompagnent d'une apoptose dans les régions CA1 et CA3, mais absente de la région du DG (Nishio *et al*, 2010).

XV.3. Types cellulaires impliqués

La spectroscopie par IRM met en évidence une perte neuronale caractérisée par un ratio N-acétylaspartate/créatinine augmenté chez des rats ischémiés 5 mois après l'opération du côté ipsilatéral. Dans la même étude, le ratio myoinositol/créatinine est augmenté dans l'hippocampe ipsilatéral signe d'une activation inflammatoire en réponse à l'ischémie à 3 mois de post-ischémie chez les rats (Xie *et al*, 2011). Une perte neuronale est démontrée dans la zone CA1, de manière concomitante à une astrogliose au sein de cette région dans un modèle d'arrêt cardiaque (Kiryk *et al*, 2011). Les mécanismes inflammatoires perdurent jusqu'à 1 an sur des rats ischémiés-reperfusés avec la présence de macrophages au niveau de zones hypointenses en signal T2. Ce marquage inflammatoire est corrélé avec la présence de fer qui joue un rôle dans les premières phases de l'ischémie et notamment

dans le stress oxydant (Karki *et al*, 2010). Une désorganisation des fibres myélinisées a été démontrée notamment au sein du corps calleux du côté ipsilatéral à la lésion chez des rats I/R à 1 mois (Virley *et al*, 2000). Résultat corroboré par IRM 3 semaines après l'opération, toutefois, à 9 semaines, plus aucune différence n'est observée entre les deux côtés (Van Der Zijden *et al*, 2008a).

XV.4. Cascade neurodégénérative

Les recherches, aujourd'hui, établissent une étroite relation entre maladie d'Alzheimer et AVC. Dans un modèle de rat hypoperfusé, l'expression de l'ARNm de l'APP est augmentée dès le 4^{ème} jour de reperfusion au sein de la pénombre et du cœur de l'ischémie qui perdurent jusqu'au 7^{ème} jour de reperfusion (Shi *et al*, 2000). Une étude comparative en fonction de l'âge des animaux ischémiés-reperfusés (jeunes et âgés) pointe une surexpression de l'APP C-terminale dès 3 jours de reperfusion en pourtour de l'infarctus ce que corroborent d'autres études (Nihashi *et al*, 2001). En revanche, le suivi montre une expression maximale à 14 jours de post-ischémie au sein du groupe âgé tandis que le groupe jeune verra son expression maximale atteinte à 28 jours de post-ischémie. Aucune expression n'est détectée au sein de l'hémisphère controlatéral ou du groupe sham. Quant au phénotype des cellules marquées, elle révèle une immunoréactivité de l'APP au sein des neurones, à différents temps de post-ischémie (7 jours chez les rats âgés et 28 jours chez des rats jeunes). En revanche, aucun marquage n'est observé parmi la microglie activée ou les astrocytes (Badan *et al*, 2004). *A contrario*, d'autres travaux mettent en évidence le peptide A β au sein des astrocytes et une immunoréactivité de l'APP dans la microglie activée surexprimée à 14 jours de reperfusion (Popa-Wagner *et al*, 1998) et dans les astrocytes à 28 jours de post-ischémie (Nihashi *et al*, 2001). Le peptide A β n'est pas décelé à 3 jours de reperfusion mais faiblement exprimé à partir de 7 jours au sein des astrocytes. Cette expression est présente à 14 puis 30 jours de post-ischémie, mais ce peptide est absent de la zone péri-infarctus (Nihashi *et al*, 2001). A 1 an de post-ischémie, dans un modèle d'ischémie induite par arrêt cardiaque chez le rat, une expression de la partie C-terminale de l'APP ainsi que du peptide A β est décelée en pourtour des vaisseaux composant la BHE mais également au niveau de l'hippocampe, du cortex entorhinal et du corps calleux. Plus précisément, les dépôts sont présents au niveau des astrocytes et des capillaires composant la BHE (Jablonski *et al*, 2011). Cette répartition au sein du tissu cérébral peut être expliquée par une migration de l'APP et du peptide A β de leur lieu de présence initiale (la zone péri-infarctus) vers le thalamus via les voies efférentes au fur et à mesure du temps. A 1 mois de post-ischémie, ces protéines sont encore présentes au sein de la zone péri-lésionnelle, en revanche, à 9 mois de post-ischémie, cette immunoréactivité n'est présente qu'au sein du thalamus (Van Groen *et al*, 2005).

XV.5. Métabolisme

Le métabolisme glucidique est lui aussi fortement perturbé durant l'ischémie mais également durant la reperfusion. L'étude par Tomographie à Emissions de Positrons (TEP) révèle un métabolisme glucidique altéré et inférieur de 20 % à 6 mois de post-ischémie au sein du cortex, du striatum et de l'hippocampe du côté ipsilatéral (Nishio *et al*, 2010).

Par ailleurs, il apparaît au décours d'une ischémie cérébrale une réduction de la densité de fibres cholinergiques dans le cortex adjacent à la capsule externe (20 % de fibres dans cette région vs 40 % chez les souris sham) (Nishio *et al*, 2010). En lien avec ces observations, des études précliniques ont montré une diminution de l'activité acétylcholine estérase dans le plasma de 33,8 % tandis que cette même activité est augmentée de 75,5 % au sein de l'hippocampe ipsilatéral alors qu'aucune variation n'est observée au sein des cortex cérébraux (Xiao *et al*, 2011). Cette activité enzymatique dans le plasma est négativement corrélée au temps de latence pour atteindre la plate-forme mais positivement corrélée au nombre de croisements sur la plate-forme le jour du test (Xiao *et al*, 2011).

Présentation du travail

Un nombre non négligeable de patients ayant subi un accident vasculaire cérébral vont développer une démence parfois associée à un handicap fonctionnel résiduel qui va réduire considérablement leur qualité de vie aussi bien familiale que professionnelle et induire une dépendance. La prévalence de ce phénomène augmente en raison de la survie plus importante des patients et de l'augmentation de leur âge. La pathologie de l'AVC est progressive et après les premiers jours et les premières semaines, des mécanismes continuent à se mettre en place avec des effets positifs ou négatifs sur le devenir du patient. C'est à cette phase chronique que nous voulions nous intéresser dans ce travail.

Aujourd'hui, les études précliniques sur des modèles animaux permettent la compréhension des mécanismes pathologiques sous-jacents. Cependant, elles se focalisent majoritairement sur la phase aiguë ou subaiguë de l'ischémie cérébrale. Nous avons mis en place un protocole à long terme d'étude de l'ischémie cérébrale chez le rat pour pouvoir suivre et identifier de manière concomitante l'évolution des lésions cérébrales et les déficits fonctionnels et mnésiques sur une durée de 6 mois après l'induction de la lésion afin de constituer une base de données assez large sur les conséquences à long terme de l'ischémie-reperfusion cérébrale.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux altérations cognitives et fonctionnelles qui peuvent découler de la survenue d'une ischémie-reperfusion réalisée par le modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez le rat couramment utilisé au laboratoire. Les résultats nous prouvent que des altérations cognitives surviennent à différents temps de post-ischémie. En parallèle à ces déficits de mémoire, les animaux présentent des déficits fonctionnels. Quelque soit la nature du déficit, il est apparu que certains se résolvent spontanément dans le temps alors que d'autres persistent ou apparaissent tardivement.

L'étude *in vivo* en IRM a permis de suivre concomitamment l'évolution lésionnelle et anatomique au niveau du cerveau des rats au cours de la période de post-ischémie. Ce suivi a démontré une stabilisation du volume de la lésion entre 7 jours et 6 mois après l'opération. En revanche, nous avons pu mettre en évidence la différenciation de cette lésion et du tissu associé, dès 7 jours de reperfusion. L'étude anatomique permet d'observer l'apparition de zones d'atrophies au sein du tissu cérébral dès 1 mois de post-ischémie qui perdurent tout au long de l'étude. L'examen de certaines régions d'intérêt directement reliées aux activités comportementales révèle des changements anatomiques permettant d'expliquer certains déficits observés.

Grâce aux échantillons prélevés sur les animaux, nous avons, dans un troisième temps, recherché des explications au niveau cellulaire voir moléculaire pour expliquer les

observations macroscopiques obtenues sur l'animal *in vivo*. L'étude des cerveaux des animaux ischémiés-reperfusés nous a amené, par comparaison aux cerveaux des animaux sham, à montrer des modifications de l'organisation cellulaire dans des régions d'intérêt directement impliquées dans les processus mnésiques et de suggérer l'implication de la baisse d'expression d'un facteur neurotrophique, le BDNF dans les processus d'atrophie. L'ensemble de ces résultats nous ont permis de mettre en évidence que l'atrophie des régions hippocampique et corticale ipsilatérales à la lésion était fortement impliquée dans les déficits mnésiques observés dans la phase chronique de la pathologie. Ces travaux ont été rassemblés dans un article actuellement soumis et présenté ici en annexe.

L'ensemble des résultats amènera à discuter des liens entre (i) plasticité cérébrale et récupération fonctionnelle motrice ; (ii) perturbations mnésiques et démence ; (iii) des perspectives et de la pertinence du modèle d'étude à long terme d'ischémie cérébrale dans la détermination de nouvelles fenêtres ou cibles thérapeutiques.

Matériels et méthodes

I. Animaux

L'ensemble de cette étude a été réalisé chez des rats mâles de souche Wistar provenant de l'élevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). A leur arrivée, ils sont âgés de 10 semaines et sont soumis au protocole d'ischémie-reperfusion à un poids compris entre 280 et 330 g. Ils sont hébergés dans une pièce climatisée à 22 °C et soumis à un cycle jour-nuit de 12 heures avec éclairage à 7 h. Les rats bénéficient d'un libre accès à l'eau et à la nourriture durant l'hébergement. Ils sont pesés une fois par semaine afin de suivre l'évolution de leur poids et sont examinés régulièrement afin de déceler toute anomalie ou souffrance physique.

II. Protocole

L'ensemble des expériences a été mené selon le schéma chronologique ci-dessous (figure 41). Chaque rat est testé en comportement une seule fois afin qu'ils soient naïfs devant le test. Les animaux effectuent les tests comportementaux puis sont soumis à un examen IRM avant d'être sacrifiés.

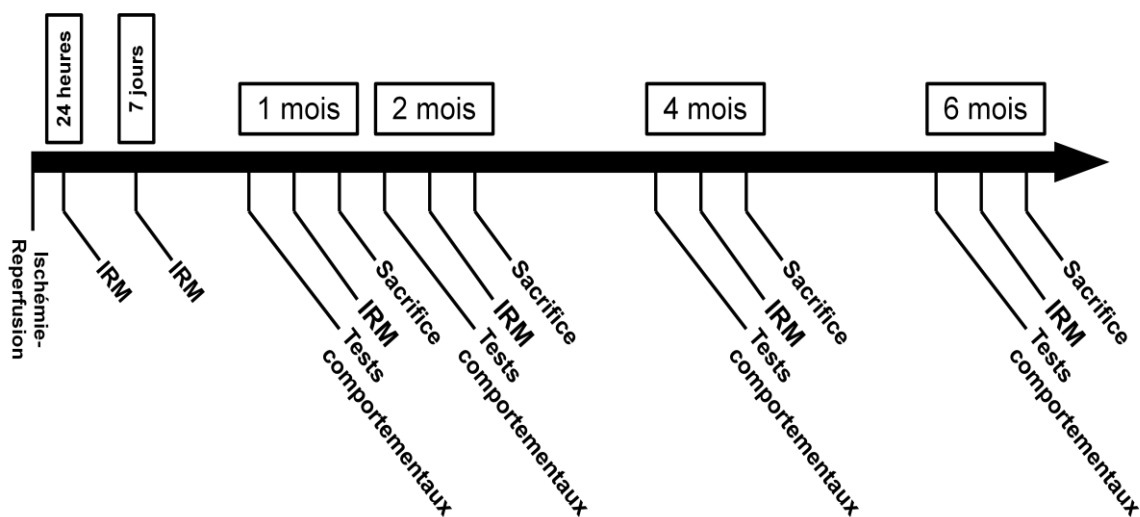


Figure 41 : Schéma représentant le protocole de l'étude

III. Modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne

Après anesthésie par de l'hydrate de chloral (300 mg.kg⁻¹ par animal) ALDRICH®, l'animal est placé en décubitus dorsal afin de dégager la région cervicale. Celle-ci est incisée afin de mettre en évidence la bifurcation carotidienne droite. A l'aide d'un microscope chirurgical (Leica M651), cette artère ainsi que la carotide externe sont disséquées, cette dernière étant ligaturée à son origine. L'artère ptérygopalatine (première branche de division

de l'artère carotide interne) est également disséquée et ligaturée à son origine. Enfin, la carotide primitive est ligaturée le plus en amont possible de la bifurcation. Dans ces conditions, un micro-clip chirurgical est posé sur la partie distale de la carotide primitive. Une artériotomie est alors réalisée sur la carotide primitive afin de permettre le passage d'un fil de nylon chirurgical 4.0 (Ethicon) dont l'extrémité est préalablement arrondie à la flamme. Ce filament est sécurisé par une suture sous la bifurcation. Le micro-clip est alors retiré et le fil est prudemment avancé dans l'artère carotide interne afin que son extrémité vienne obstruer l'ostium de l'artère cérébrale moyenne, soit une longueur calibrée de 22 mm au-delà de la bifurcation carotidienne (figure 42). L'extrémité restante du fil de nylon est disposée soigneusement à l'extérieur de la plaie puis l'incision cervicale est refermée.

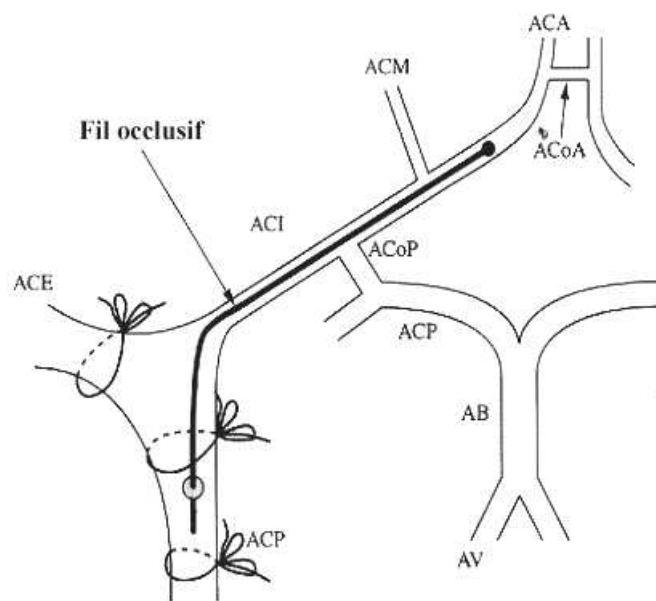


Figure 42 : Schéma représentant le modèle d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne droite.

ACE : Artère Carotide Externe ; ACP : Artère Carotide Primitive ; ACI : Artère Carotide Interne ; ACA : Artère Cérébrale Antérieure ; ACM : Artère Cérébrale Moyenne ; ACPo : Artère Cérébrale Postérieure ; ACoA : Artère Communicante Antérieure ; ACoP : Artère Communicante Postérieure ; AV : Artère Vertébrale ; AB : Artère Basilaire

Après 1 heure, le fil de nylon est délicatement retiré par son extrémité. Cette dernière étape marque le début de la phase de reperfusion et permet le retour de la circulation sanguine dans l'artère cérébrale moyenne par l'intermédiaire du polygone de Willis.

En parallèle, des groupes d'animaux sham (non ischémiés) sont réalisés, les animaux subissent les mêmes étapes opératoires hormis l'occlusion. Les rats sont anesthésiés, les différentes ligatures (ptérygopalatine, artères carotide externe et primitive) sont placées puis le fil qui servait au maintien du fil d'occlusion en cas d'ischémie sert ici de

ligature définitive chez les sham afin de réaliser l'artériotomie sans provoquer d'hémorragie (Simerabet *et al*, 2008).

IV. Imagerie par Résonance Magnétique

L'ensemble de cette étude a été effectué sur la plate-forme d'imagerie du vivant de l'Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique (IMPRT).

IV.1. Appareil

Les images ont été obtenues sur une IRM 7 Tesla (Bruker Biospec Ettlingen Allemagne) équipée du logiciel Paravision 5.1. L'équipement est constitué d'une antenne surfacique de réception positionnée sur la tête de l'animal et d'une antenne cylindrique d'émission de 72 mm de diamètre interne (Figure 43). L'animal repose dans un berceau placé à l'intérieur de l'antenne d'émission où il est continuellement soumis à une concentration d'isoflurane de 2 à 3 % en fonction de sa fréquence ventilatoire, additionné d'un mélange de 50 % d'air ambiant et 50 % d'oxygène, qui le maintient endormi au cours des acquisitions. Chaque rat effectue une IRM cérébrale à des temps bien définis, 24 heures, 7 jours, 1, 2, 4 et 6 mois. Le temps de passage de chaque rat est d'environ 40 min.

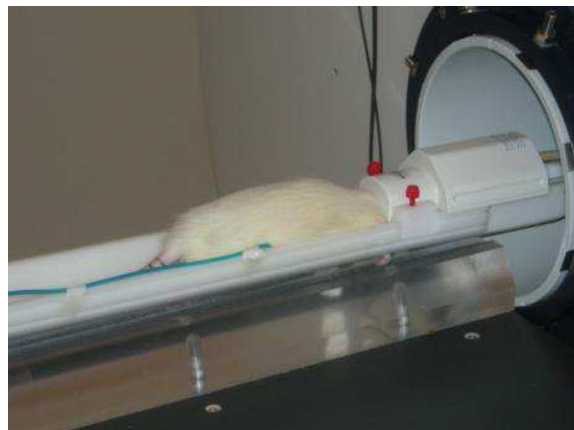


Figure 43 : Photo d'un rat placé dans le berceau de l'IRM avec l'antenne de surface cérébrale avant d'être placé au cœur de la machine

IV.2. Séquence préliminaire

Au préalable, une séquence de référence est réalisée permettant de connaître le positionnement de la tête de l'animal au sein de la machine afin de placer *a posteriori* les coupes des séquences d'intérêt.

Trois séquences d'intérêts sont effectuées : une séquence anatomique T2 appelée Spin Echo TurboRARE T2, une séquence de diffusion (DWI) et une séquence de susceptibilité au fer (SWI). Celles-ci sont réalisées avec un champ de vue carré de 2,5 cm de

côté codé par une matrice carrée de 256. La résolution spatiale des images obtenues atteint 100 μm .

IV.3. Séquence anatomique T2

La séquence anatomique pondérée en T2 est de type Spin Echo TurboRARE « Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement » (Hennig *et al*, 1986). Cette séquence permet d'étudier l'anatomie du cerveau et par conséquent, permet la quantification lésionnelle des tissus. La séquence anatomique T2 se décompose en deux temps. D'une part, 20 coupes axiales contiguës de 0,85 mm couvrent l'ensemble du cerveau de l'animal avec les paramètres de séquence suivants : la pondération T2 est atteinte avec un temps de répétition (TR) de 5000 ms et un temps d'écho (TE) de 77 ms. D'autre part, une autre séquence T2 est effectuée grâce à 26 coupes coronales contiguës de 0,4 mm avec les paramètres suivants : un TR de 5000 ms et un TE de 33 ms.

IV.4. Séquence de diffusion

La méthode utilisée pour l'étude de la diffusion est intitulée DWI « Diffusion Weighted Imaging ». Cette séquence permet d'étudier les mouvements d'eau au sein du tissu et plus particulièrement, le degré de liberté de mouvements des molécules d'eau au niveau extracellulaire. En effet, plus les molécules d'eau ont de l'espace, plus le coefficient apparent de diffusion va être élevé, reflétant un tissu lâche (Le Bihan *et al*, 1986). Cette séquence de diffusion consiste en 10 coupes contiguës de 1,7 mm dans le plan axial couvrant l'ensemble du cerveau. Les paramètres de cette séquence sont un TR de 3000 ms et un TE de 30 ms. Le coefficient apparent de diffusion est calculé à partir de 7 valeurs de b comprises entre 0 et 1000 $\text{s}\cdot\text{mm}^2$. Les valeurs de b désignent l'intensité du champ magnétique qui est appliqué durant l'acquisition afin de déterminer le degré de liberté des molécules d'eau. La saisie des valeurs des coefficients apparents de diffusion est réalisée sur 8 régions d'intérêt « ROI : Region Of Interest » du côté ipsilatéral et du côté controlatéral mesurant chacune quelques pixels. Les résultats présentés correspondent au ratio du coefficient apparent de diffusion entre le côté ipsilatéral et le côté controlatéral au cours du temps. Le corps calleux (6 pixels ou 0,586 mm^2), le cortex correspondant à la patte avant (16 pixels ou 1,56 mm^2) et le noyau caudé (21 pixels ou 2,05 mm^2) sont étudiés sur un premier plan de coupe situé 0,20 mm en amont du bregma. L'hippocampe (12 pixels ou 1,17 mm^2), le thalamus (12 pixels ou 1,17 mm^2), le cortex pariétal (21 pixels ou 2,05 mm^2) et l'amygdale (9 pixels ou 0,879 mm^2) sont étudiés sur un deuxième plan de coupe situé 2,80 mm en aval du bregma. Le cortex entorhinal (9 pixels ou 0,879 mm^2) est étudié sur un troisième plan de coupe situé à 5,30 mm en aval du bregma.

IV.5. Séquence de susceptibilité au fer

Une séquence en écho de gradient utilisant la méthode FLASH « Fast Low Angle Shot » est utilisée afin de mettre en évidence les molécules de fer présentes au sein du tissu (Haacke *et al*, 2004). Elle est réalisée sur 1 plan de coupe de 850 µm avec les paramètres suivants : un TR de 350 ms, un TE de 18 ms, un angle de bascule de 40° codé par une matrice de 512 x 512 et un champ de vue de 40 x 40 mm aboutissant à une résolution de 80 x 80 x 850 µm. L'analyse est qualitative, chaque plan de coupe est scoré de 0 (- ou absence de Fer) à 5 (+++++ lorsque le Fer est fortement présent).

IV.6. Analyse de la séquence T2

Les données DICOM « Digital Imaging and COmmunications in Medicine » de la séquence T2, sont analysées grâce au logiciel ITK-SNAP 1.8 www.itksnap.org (Yushkevich *et al*, 2006). Les zones diffèrent selon le temps de reperfusion et sont analysées sur les plans de coupes coronales (tableau 1). Les données sont exprimées en mm³.

24 heures	7 jours	Mois
<i>Cerveau</i>	<i>Cerveau</i>	<i>Cerveau</i>
		<i>Cavité porencéphalique</i>
<i>Lésion corticale</i>	<i>Lésion corticale hyposignal</i>	<i>Lésion corticale hyposignal</i>
	<i>Lésion corticale hypersignal</i>	<i>Lésion corticale hypersignal</i>
<i>Lésion sous-corticale</i>	<i>Lésion sous-corticale hyposignal</i>	<i>Lésion sous-corticale hyposignal</i>
	<i>Lésion sous-corticale hypersignal</i>	<i>Lésion sous-corticale hypersignal</i>
<i>Hémisphère droit</i>	<i>Hémisphère droit</i>	<i>Hémisphère droit</i>
<i>Hémisphère gauche</i>	<i>Hémisphère gauche</i>	<i>Hémisphère gauche</i>
<i>Ventricule gauche</i>	<i>Ventricule gauche</i>	<i>Ventricule gauche</i>
<i>Hippocampe gauche</i>	<i>Hippocampe gauche</i>	<i>Hippocampe gauche</i>
<i>Ventricule droit</i>	<i>Ventricule droit</i>	<i>Ventricule droit</i>
<i>Hippocampe droit</i>	<i>Hippocampe droit</i>	<i>Hippocampe droit</i>

Tableau 1 : Détail des zones segmentées à partir des données DICOM en fonction du temps de post-ischémie

A partir de ces différentes zones, plusieurs lésions sont mesurées (figure 44). Le volume de la lésion totale correspond à l'addition des volumes des lésions en fonction du temps, ainsi que la différenciation de la lésion corticale et sous-corticale. De même, les volumes de lésion composée d'hyposignal et la lésion uniquement composée d'hypersignal sont mesurés ainsi que le volume des cavités porencéphaliques. Les volumes du cerveau, des hémisphères et des hippocampes permettent d'évaluer les atrophies. Le volume des ventricules est également mesuré.

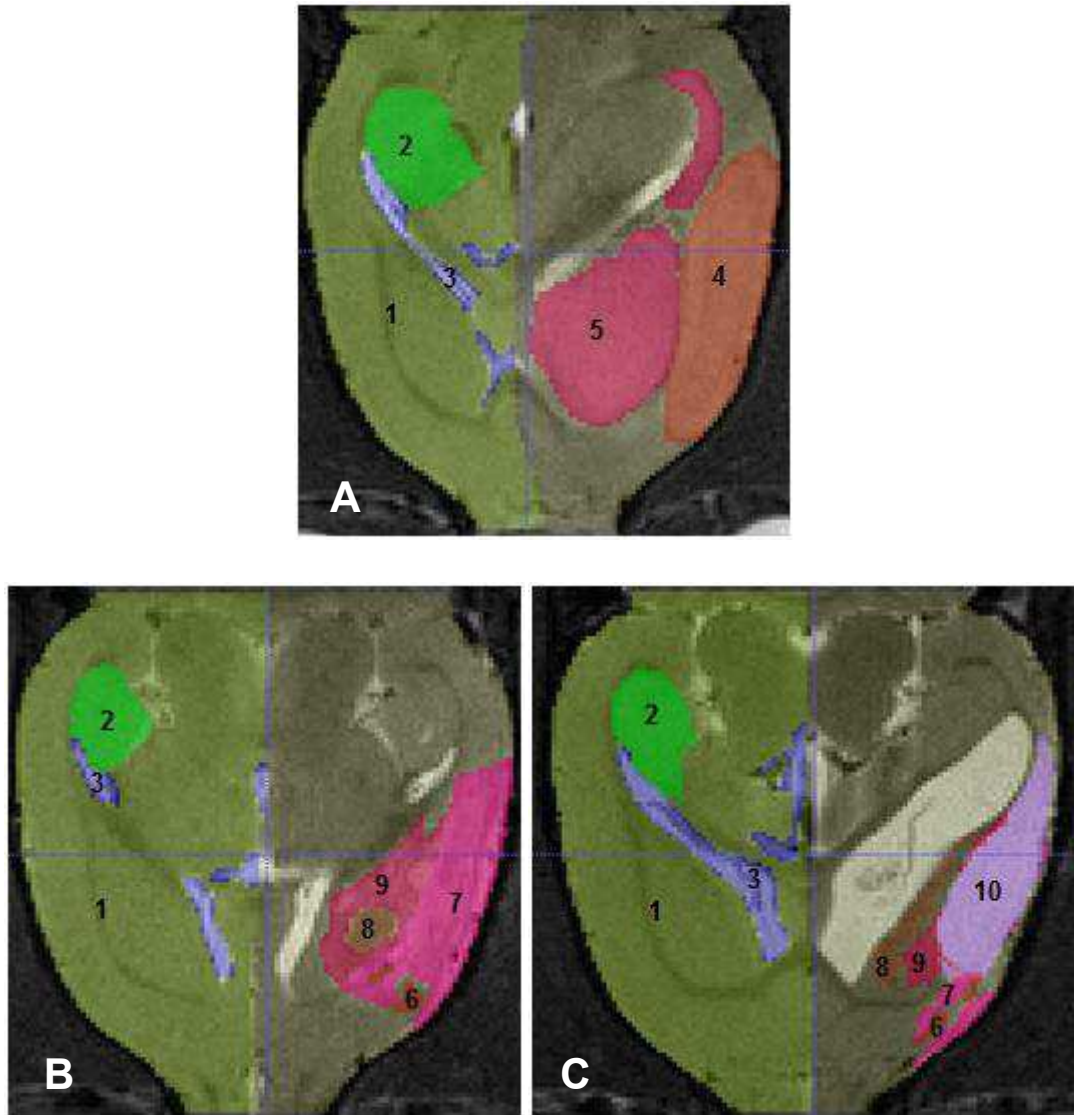


Figure 44 : Segmentation grâce au logiciel ITK-Snap 1.8 sur une coupe coronale anatomique T2 de rat, A : à 24 heures de reperfusion, B : à 7 jours de reperfusion, C : à 1 mois de post-ischémie.

A : 1 : hémisphère gauche, 2 : hippocampe gauche, 3 : ventricule gauche, 4 : lésion corticale, 5 : lésion sous-corticale.

B : 1 : hémisphère gauche, 2 : hippocampe gauche, 3 : ventricule gauche, 6 : lésion corticale hyposignal, 7 : lésion corticale hypersignal, 8 : lésion sous-corticale hyposignal, 9 : lésion sous-corticale hypersignal.

C : 1 : hémisphère gauche, 2 : hippocampe gauche, 3 : ventricule gauche, 6 : lésion corticale hyposignal, 7 : lésion corticale hypersignal, 8 : lésion sous-corticale hyposignal, 9 : lésion sous-corticale hypersignal 10 : cavité porencéphalique.

L'épaisseur du cortex entorhinal est mesurée sur le plan de coupe situé à 5,30 mm en aval du bregma à l'aide du logiciel ImageJ (Abramoff *et al*, 2004) à partir des images TIFF obtenues (figure 45). Cette épaisseur est mesurée des deux côtés et exprimée en mm.

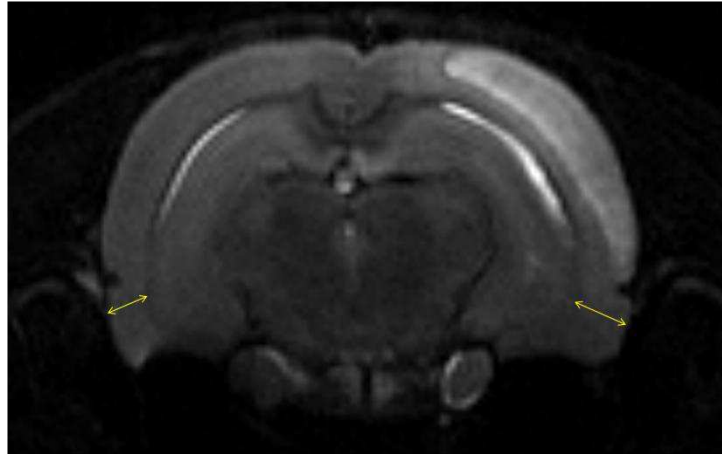


Figure 45 : Image IRM en séquence anatomique T2 d'un rat à 24 heures de reperfusion (flèche jaune : mesure de l'épaisseur du cortex entorhinal)

V. Tests comportementaux

Les tests comportementaux se déroulent sur deux semaines consécutives. Le test nécessitant un pré-conditionnement est effectué en premier puis les autres tests se déroulent du moins stressant au plus stressant (figure 46). Le test de la piscine de Morris a été effectué sur d'autres groupes de rats. Les tests sont effectués aux temps suivants : 1, 2, 4 et 6 mois après l'opération hormis pour le test de la piscine de Morris qui n'a été effectué qu'à 6 mois.

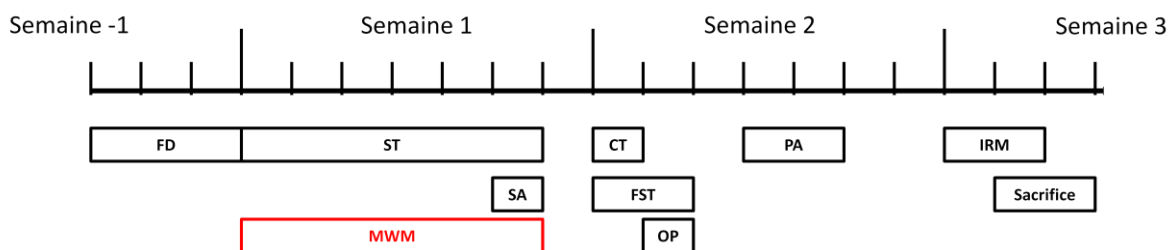


Figure 46 : Schéma du protocole d'étude des tests comportementaux. FD : Privation de nourriture, ST : Test de l'escalier, MWM : Test de la piscine de Morris, SA : Test de l'alternance spontanée, CT : Test du cylindre, FST : Test de la nage forcée, OP : Test de l'actimétrie, PA : test de l'évitement passif

V.1. Test de l'actimétrie

V.1.1. Principe du test

Ce test permet de mesurer l'activité motrice spontanée du rat dans une enceinte.

V.1.2. Appareil et déroulement du test

L'actimètre (Panlab) est un appareil composé d'une enceinte de plexiglas de dimensions 45 x 45 x 35 cm avec une lumière de 270 Lux, cerclée de deux rangées de capteurs à infra-rouges d'une épaisseur de 3 cm. Il est contrôlé par le bloc LE 8811 Motor

Activity Monitor V 20/01/04. La première rangée de capteurs permet de mesurer tous les mouvements de motricité horizontale (la locomotion) et est située à une hauteur de 0,5 cm par rapport à la base de l'actimètre (figure 47). La deuxième rangée de capteurs permet de mesurer les redressements et est placée à une distance de 12 cm par rapport à la base de l'actimètre. Un peu de litière est placé dans l'enceinte et mélangé entre chaque rat afin de contrôler l'homogénéité des odeurs. Le rat est placé dans l'enceinte de l'actimètre durant 10 min (Marche *et al*, 2010).



Figure 47 : Photo d'un rat dans l'actimètre

V.1.3. Evaluation

L'évaluation est effectuée par le logiciel Acti-Track DT Version 2.75, Panlab. Au préalable, le logiciel définit deux zones virtuelles, une zone centrale représentant 1/9 de la surface de l'enceinte et une zone périphérique. Les paramètres mesurés sont les suivants : la distance totale parcourue, la vitesse moyenne ainsi que le pourcentage d'inactivité.

V.2. Test de l'escalier

V.2.1. Principe du test

Premièrement décrit par Montoya en 1991 (Montoya *et al*, 1991), le protocole a été adapté à notre étude à partir de précédents travaux (Nikkhah *et al*, 1998 ; Fréret *et al*, 2006). Ce test requiert une phase de pré-conditionnement et permet d'apprécier la dextérité des pattes avant de l'animal dans le but de récupérer et manger des granulés de chocolat afin de satisfaire sa faim. Ce test se déroule sur six jours consécutifs, cinq jours d'apprentissage et le dernier jour consiste en la phase de test.

V.2.2. Appareil et déroulement du test

L'appareil (Modèle 80300, Campden Instruments Ltd, Royaume-Uni) consiste en une boîte de plexiglas, divisée en deux compartiments, sous une lumière de 140 Lux. Un premier compartiment où placer le rat, de dimensions 19 x 12 x 12 cm et un deuxième

compartiment plus fonctionnel de dimensions 16 x 6,5 x 12 cm comprenant une plate-forme de dimensions 16 x 2,8 x 6,5 cm où va se positionner le rat durant le test. Cette plate-forme donne accès à deux escaliers, le gauche n'étant accessible qu'à la patte gauche de l'animal et réciproquement pour le côté droit. Chaque escalier d'une hauteur de 4 cm pour 10 cm de longueur comprend sept marches, d'une longueur de 1,4 cm. Chacune est formée d'une cupule de 5 mm de profondeur et de 1 cm de diamètre permettant d'y placer trois granules de nourriture. Un miroir incliné à 45° est placé afin de pouvoir observer le côté droit dans le reflet du miroir.

Du 7^{ème} au 3^{ème} jour précédant le début du test, ces mêmes granules de chocolat sont placés dans leur cage afin de permettre une habitude du rat à leur goût et à leur odeur. Le rat est ensuite placé à jeun 72 heures avant le début du test afin de créer une appétence et d'amener son poids entre 85 et 90 % de son poids habituel durant toute la durée du test. Pendant la phase de conditionnement, la nourriture est progressivement restreinte de 15 g à 3 g par jour (par palier de 3 g) par rat. Le rat est pesé tous les matins 30 min avant le début du test. La phase de conditionnement consiste à placer l'animal dans le test durant 15 min tous les jours pendant 5 jours et à noter le nombre et la position sur l'escalier de chaque granule attrapé et/ou mangé des deux côtés du test (figure 48).



Figure 48 : Photo d'un rat dans le test de l'escalier, attrapant et mangeant les granules de chocolat à l'aide de sa patte controlatérale

La phase de test est enregistrée par une caméra numérique et regardée ultérieurement par deux personnes. Ce test se déroule en deux phases, dans un premier temps, seul le côté controlatéral du test contient des granules et le rat dispose de 5 min pour les attraper et les manger. Puis il est replacé dans sa cage et 30 min après, il est replacé dans l'appareil pour tester le côté ipsilatéral pour une durée de 5 min. L'enregistrement permet d'apprécier le nombre et la position sur l'escalier de chaque granule attrapé et/ou mangé des deux côtés du test.

V.2.3. Evaluation

Les rats qui mangent moins de sept granulés par jour sur les deux côtés confondus durant les trois derniers jours du conditionnement sont exclus. L'évaluation consiste à calculer le ratio de granulés mangés à l'aide de la patte controlatérale par rapport à la patte ipsilatérale lors de la phase de test.

V.3. Test du cylindre

V.3.1. Principe du test

Ce test permet d'étudier l'utilisation asymétrique des pattes de l'animal.

V.3.2. Appareil et déroulement du test

Le protocole a été adapté à partir de travaux précédents (Hewlett & Corbett, 2006). Pour cela, un cylindre de plexiglas de 20 cm de diamètre pour 40 cm de hauteur sous une lumière de 120 Lux est utilisé (figure 49). Le dispositif est posé sur une plaque transparente, au-dessous de laquelle se trouve un miroir incliné de 45°. Le rat est placé dans le cylindre pendant une durée de 10 min. Le test est filmé à l'aide d'une caméra numérique enregistrant le reflet du rat dans le miroir et est regardé *a posteriori* par deux observateurs.



Figure 49 : Photo d'un rat durant le test du cylindre

V.3.3. Evaluation

L'évaluation s'effectue sur les 18 premiers redressements ; les rats n'ayant pas atteint ce quota sont exclus du test. La patte qui est posée en premier sur les parois du cylindre est déterminée pour chaque redressement. Trois choix sont possibles : la patte controlatérale, la patte ipsilatérale ou les deux pattes en même temps. Avant de comptabiliser le redressement suivant, le rat doit avoir reposé les quatre pattes sur le plancher. A partir de ces données, un pourcentage est calculé selon la formule suivante :

$$\frac{\left[\text{Contacts ipsilatéraux} + \frac{1}{2} \text{Contacts bilatéraux} \right]}{\text{Contacts totaux}} \times 100$$

Plus ce score est élevé, plus il reflète l'utilisation de la patte ipsilatérale aux dépens de la patte controlatérale chez le rat.

V.4. Test de la nage forcée

V.4.1. Principe du test

La nage forcée, mise au point chez le rat et la souris vers la fin des années 1970 (Porsolt *et al*, 1977) permet d'évaluer l'efficacité des traitements antidépresseurs.

V.4.2. Appareil et déroulement du test

Ce test est effectué dans un bécher (Médicolab international) d'une hauteur de 40 cm pour un diamètre de 20 cm. Le bécher est rempli de telle sorte que la hauteur d'eau soit égale à 27 cm lorsque l'on y place le rat avec une température de 21 °C (± 1 °C) et une lumière de 170 Lux. Chez le rat, ce test se déroule en deux phases, une phase de pré-conditionnement d'une durée de 15 min ; 24 heures après ce premier passage, le rat est replacé dans le bécher, pour la phase de test d'une durée de 5 min (session qui est filmée et analysée *a posteriori* par deux observateurs) (Detke & Lucki, 1996). Après chaque passage, l'eau est changée afin d'éliminer l'urine, les excréments et la fourrure. De plus, les rats sont séchés au sortir de l'eau et placés sous une lampe chauffante pendant 30 min.

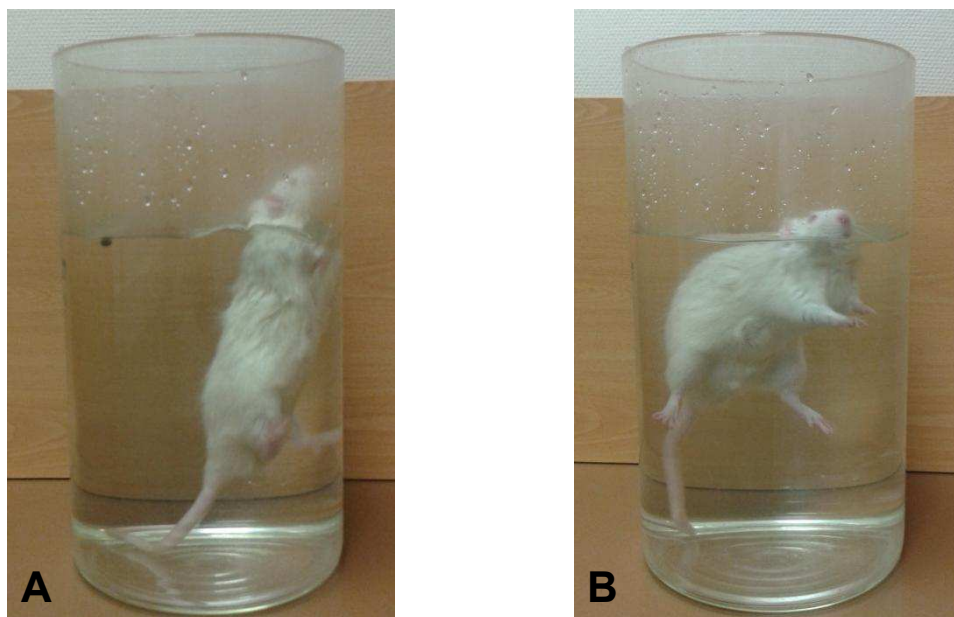


Figure 50 : Photos d'un rat durant le test de la nage forcée (A) en phase mobile et (B) en phase immobile.

V.4.3. Evaluation

L'évaluation porte uniquement sur la phase de test durant laquelle le temps de nage de l'animal est comptabilisé (figure 50A). Plus ce temps est élevé, plus le traitement que l'animal a reçu présente un effet antidépresseur. L'animal est considéré comme immobile

lorsqu'il n'effectue que quelques mouvements maintenant sa tête hors de l'eau (figure 50B). Ce test est effectué juste après le test de l'actimétrie afin d'exclure les rats qui ont une motricité altérée et qui sont, par conséquent, incapables de nager. Sont également exclus de ce test, les rats sortis du bécher pendant le pré-conditionnement ou le test.

V.5. Test de l'alternance spontanée

V.5.1. Principe du test

Ce test est couramment utilisé pour étudier l'utilisation de la mémoire de travail.

V.5.2. Appareil et déroulement du test

Ce test se déroule dans un labyrinthe en forme de Y en bois peint en noir, de dimensions 50 x 15,5 x 32 cm avec des bras formant un angle constant de 120°. La lumière présente dans les 3 bras est de 30 Lux et 70 Lux au niveau du centre du labyrinthe. Le labyrinthe se trouve dans une pièce aux murs blancs sans repère. Ce test ne nécessite pas de conditionnement. Les trois bras sont notés virtuellement A, B et C et chaque passage est filmé par une caméra. Le rat est placé dans le bras B au début du test et est laissé libre d'explorer les trois bras durant une période de 8 min (figure 51). Les excréments et l'urine sont essuyés entre chaque rat pour éviter de laisser des indices olfactifs.



Figure 51 : Photo d'un rat dans le labyrinthe en Y lors du test de l'alternance spontanée

V.5.3. Evaluation

Les enregistrements sont regardés *a posteriori* par une personne et la succession des bras visités est notée. L'entrée du rat est comptabilisée dès lors que ses quatre pattes sont dans le bras. A partir de cette succession de visites, est calculé un score d'alternance selon la formule suivante :

$$\frac{\text{nombre d'alternances}}{\text{nombre total de visites} - 2} \times 100$$

Une alternance correspond à la succession des trois bras dans un triplet de visites. Plus ce score est élevé, plus il témoigne d'une bonne capacité de la mémoire de travail de l'animal (Hidaka *et al*, 2008). Les rats réalisant moins de 20 visites sont exclus du test.

V.6. Test de l'évitement passif

V.6.1. Principe du test

Ce test est couramment employé dans l'étude de la mémoire chez les animaux car il exploite le côté anxiogène de la lumière vis-à-vis des animaux ainsi qu'un aspect aversif via le stimulus électrique.

V.6.2. Appareil et déroulement du test

L'appareil est constitué de deux enceintes reliées entre elles par une porte communicante de dimensions 8 x 8 cm. Le sol de ces deux compartiments est recouvert d'une grille conduisant l'électricité, les barreaux composant cette grille ont un diamètre de 5 mm et chaque barre est espacé du suivant de 1 cm. Le premier compartiment est une enceinte blanche ouverte de dimensions 31 x 31 x 26 cm éclairée par une lumière blanche de 1200 Lux et donc, fortement anxiogène. Le deuxième compartiment est une enceinte noire fermée de dimensions 19 x 11 x 13 cm beaucoup plus sécurisante pour l'animal car il peut s'y réfugier. Le logiciel ShutAvoid permet de commander à distance le dispositif. Les compartiments sont régulés par le PA Control LE 800 (BIOSEB) et le choc est délivré par le Shocker LE 100-26 (Panlab). Ce test se déroule en deux jours, une phase de conditionnement et une phase de test. Le premier jour, l'animal est placé dans l'enceinte blanche et explore celle-ci durant 1 min avant que la porte ne s'ouvre. Le rat dispose alors de 90 s pour rejoindre le compartiment sombre. Lorsqu'il s'y rend, il reçoit un choc électrique au niveau des pattes, via la grille, d'une durée de 1 s pour une intensité de 0,5 mA. Le rat est ensuite replacé dans sa cage (figure 52). 24 heures après, il est de nouveau replacé dans l'enceinte blanche. La porte communicante est ouverte et le rat dispose de 10 min pour retourner dans le compartiment sombre (Liu *et al*, 2008).



Figure 52 : Photo d'un rat dans l'enceinte blanche de l'évitement passif

V.6.3. Evaluation

Les rats qui ne sont pas rentrés dans le compartiment sombre lors de la phase de conditionnement sont exclus du test. Le résultat retenu correspond au temps de latence mis par l'animal pour rentrer dans le compartiment sombre le jour du test. Un animal qui ne pénètre pas dans le compartiment sombre aura un score de 600 s. Plus le temps de latence est élevé, meilleures sont les capacités mnésiques du rat.

V.7. Test de la piscine de Morris

Ce test mis en place dans les années 1980 par Morris est très couramment employé afin d'étudier les processus de mémorisation des animaux à travers plusieurs protocoles (Morris *et al*, 1982).

V.7.1. Principe du test

Ce test requiert une phase d'apprentissage d'une durée de 5 jours et une journée de test le 6^{ème} jour et se déroule selon le protocole de mémoire de référence spatiale. Le but de ce test consiste à localiser une plate-forme placée dans une piscine à l'aide d'indices spatiaux placés autour de cette piscine. Dans le protocole utilisé, la localisation de la plate-forme ne varie pas.

V.7.2. Appareil et déroulement du test

La piscine utilisée dans ce test d'un diamètre de 180 cm, est remplie d'eau, à une température de 23 °C (± 2 °C) et à une profondeur de 40 cm. L'eau est rendue blanche à l'aide d'un opacifiant. Au mur, sont placés des indices noirs dans une pièce blanche permettant un contraste des indices afin d'être mieux repérés par les animaux. La piscine est éclairée de manière indirecte par quatre néons placés aux quatre coins de celle-ci donnant une intensité de 120 Lux. Une plate-forme blanche d'un diamètre de 10 cm est placée à 1 cm sous le niveau de l'eau.

Afin d'analyser les données, la piscine est divisée virtuellement en quatre quadrants, et la plate-forme est placée au centre du quadrant Nord-Est. Les positions de départs sont les suivantes : Nord-Ouest, Ouest, Sud-Ouest, Sud et Sud-Est (les départs Nord et Est ne sont pas utilisés car trop proches de la cible) (Morris, 1984). Les rats reçoivent 5 jours d'apprentissage à raison de 4 essais par jour espacés de 15 min. Le 6^{ème} jour correspond au jour de test. Pour chaque jour d'apprentissage, les quatre positions de départ varient et l'ordre de départ est déterminé de manière aléatoire afin de ne pas favoriser la mémoire de travail (tableau 2).

<u>Localisation plate-forme</u>	<u>Jour</u>	<u>Essai 1</u>	<u>Essai 2</u>	<u>Essai 3</u>	<u>Essai 4</u>
Nord-Est	Jour 1	Ouest	Sud-Est	Sud-Ouest	Nord-Ouest
	Jour 2	Nord-Ouest	Sud	Sud-Est	Sud-Ouest
	Jour 3	Sud-Ouest	Ouest	Nord-Ouest	Sud
	Jour 4	Sud	Sud-Ouest	Ouest	Sud-Est
	Jour 5	Sud-Est	Sud	Nord-Ouest	Ouest
	Test	Ouest			
Nord-Ouest	Test Vision	Sud			

Tableau 2 : Présentation des départs successifs durant le test de la piscine de Morris

Chaque essai dure 90 s. A chaque départ, le rat est placé face contre la paroi de la piscine. Dès que le rat a trouvé la plate-forme, l'essai s'arrête et le rat est laissé 20 s sur la plate-forme afin de renforcer l'empreinte mnésique (figure 53B). Les rats qui échouent à trouver la plate-forme dans le temps imparti, sont guidés à la main jusqu'à la plate-forme où ils sont également laissés 20 s (figure 53C).

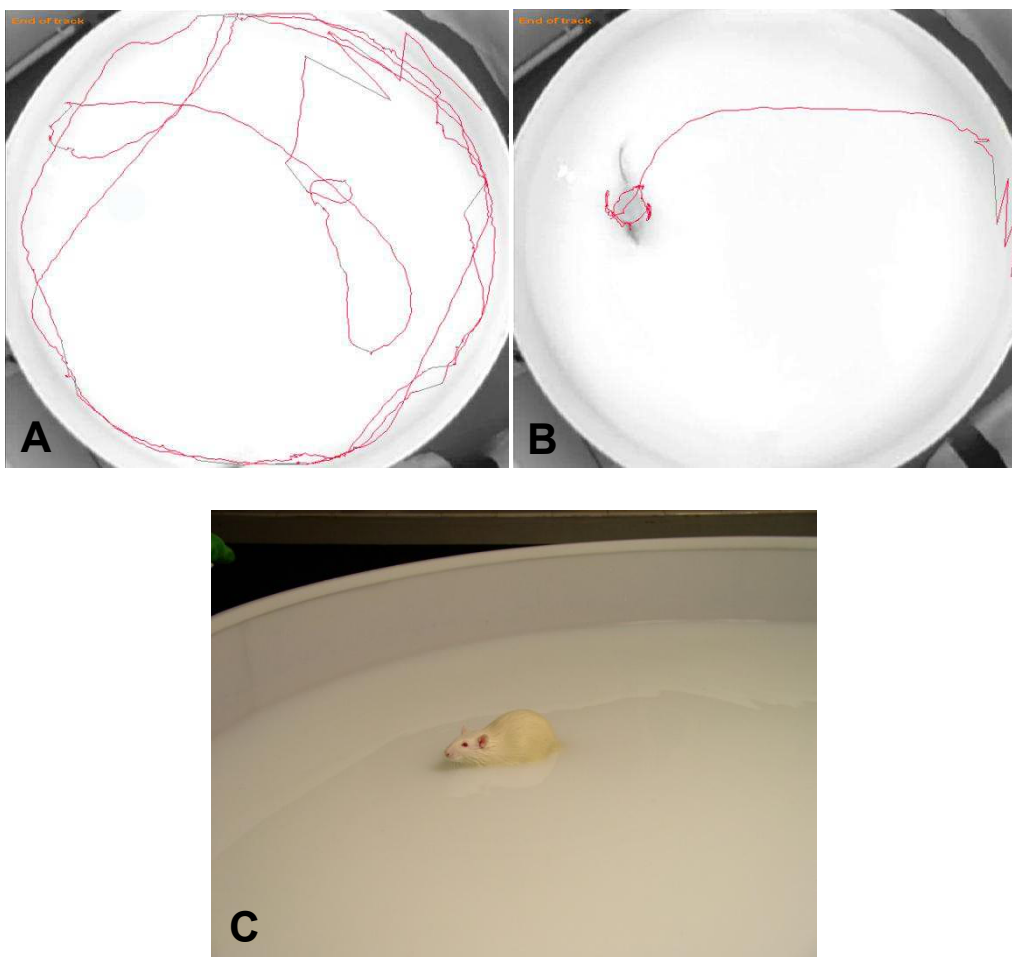


Figure 53 : Photo d'un rat pendant la phase d'apprentissage de la piscine de Morris. A : Trajet suivi par un rat ne trouvant pas la plate-forme. B : Trajet suivi par un rat trouvant la plate-forme. C : Rat sur la plate-forme.

Entre chaque passage, le rat est séché à l'aide d'une serviette et retourne dans sa cage. 24 heures après le dernier essai de la phase d'apprentissage, les animaux passent le test d'une durée de 90 s où la plate-forme est absente.

V.7.3. Evaluation

Durant l'apprentissage, le temps de latence pour atteindre et grimper sur la plate-forme est enregistré pour chaque essai. Pour les rats qui échouent, leur temps de latence est scoré à 90 s (figure 53A). Durant le test, quatre paramètres sont analysés et permettent d'attester de la mémoire de référence spatiale du rat : la latence pour atteindre la plate-forme à la fois durant la phase d'apprentissage et la phase de test, le nombre de croisements de la plate-forme, le temps passé dans chaque quadrant ainsi que la vitesse moyenne. Les essais et les tests sont enregistrés à l'aide d'une caméra placée au dessus de la piscine. Les vidéos sont analysées grâce à un logiciel dédié (Ethovision, Noldus, Wageningen, Pays-Bas).

V.7.4. Test de vision

Afin de vérifier les capacités visuelles des rats, un test de vision est pratiqué 1 heure après le test. Pour cela, les indices sont occultés par des draps blancs disposés autour de la piscine. La plate-forme est changée de quadrant (Nord-Ouest) et les rats prennent le départ à partir de la position Sud afin de s'affranchir de toute trace mnésique de l'apprentissage précédemment effectué. Sur la plate-forme est disposé un objet en plastique de couleur noire afin d'être facilement repérable. Ce test dure 90 s et les rats ne réussissant pas à trouver la plate-forme sont exclus du test.

VI. Sacrifice des animaux

Après le dernier examen d'IRM, les rats sont euthanasiés. Une dose létale de pentobarbital sodique (100 mg.kg⁻¹) (Ceva Santé Animale) est injectée par voie intrapéritonéale. Dès l'absence de réflexe, un prélèvement de Liquide Céphalo-Rachidien (LCR) est effectué à l'aide d'un microperfuseur. Celui-ci est conservé à -30 °C en attendant les études ultérieures et les échantillons contaminés par du sang sont exclus de l'étude.

VI.1. Echantillons pour les coupes

Une large thoraco-laparotomie est réalisée, permettant ainsi l'accès au cœur. Le ventricule gauche est cathétérisé et l'oreillette droite, incisée afin de pouvoir perfuser le rat à l'aide de serum physiologique hépariné, puis de paraformaldéhyde (PFA) à 4 %. Une fois la perfusion arrêtée, le rat est laissé *in situ* 1 heure avant d'être décapité. La boîte crânienne est ensuite découpée sagittalement afin de prélever le cerveau. Celui-ci est placé dans du PFA pendant une nuit à 4 °C avant de subir une déshydratation variable selon le mode de conservation du cerveau. Dans le cadre de la cryoconservation, il est déshydraté

successivement dans du sucre (SIGMA®) à 20 % puis 30 % pendant une nuit à 4 °C avant d'être congelé dans de l'isopentane (SIGMA-ALDRICH®) et conservé à -30 °C. Dans le cadre d'une conservation à température ambiante, le cerveau est placé dans de l'éthanol 70° avant déshydratation dans des bains successifs et croissants d'éthanol et de Neo-Clear®. Suite à cette étape, les cerveaux sont inclus en paraffine.

Quelque soit le mode de conservation, 8 stades sont déterminés, coupés et prélevés sur chaque cerveau selon un atlas stéréotaxique (Paxinos *et al*, 1985). Les cerveaux cryoconservés sont coupés à l'aide d'un cryostat Leica CM3050S. Des coupes de 20 µm sont effectuées et déposées sur des lames Superfrost® Plus (Thermo Scientific) et conservées à -80 °C en attendant leurs utilisations ultérieures. De même, les cerveaux inclus en paraffine sont coupés grâce à un microtome de type Leica RM2145. Les coupes d'une épaisseur de 8 µm sont placées sur des lames Superfrost® Plus Gold (Thermo Scientific) et imbibées de glycérine albuminée à 2 % afin de permettre une meilleure adhérence des coupes sur les lames. Celles-ci sont ensuite placées une nuit dans une étuve à 37 °C puis conservées à température ambiante avant utilisation.

VI.2. Mesure de la densité cellulaire

VI.2.1. Coloration Luxol Fast Blue/Crésyl Violet

Les coupes paraffinées sont utilisées pour cette coloration afin de faciliter le comptage. La première étape consiste à réhydrater les coupes paraffinées à l'aide de bains successifs décroissants d'alcool de 5 min (3 x 100° et 1 x 95°). Puis, les lames sont placées dans le Luxol Fast Blue 0,1 % (SIGMA®) pendant une nuit dans une étuve à 60 °C. Le lendemain, les lames sont rincées dans l'éthanol 95° pendant 5 min, puis dans de l'eau distillée pendant 5 min avant la différenciation des lames. Cette étape primordiale, consiste à décolorer le Luxol Fast Blue par des cycles successifs dans du lithium carbonate 0,05 % (SIGMA®) (préparé extemporanément) durant 3 min suivi d'un rinçage à l'éthanol 70° de 30 s. Le nombre de cycles dépend de chaque lame et les cycles sont répétés jusqu'à obtenir une décoloration quasi-totale du cortex, contrôlée par microscopie. Lorsque cette différenciation est terminée, les lames sont rincées dans de l'eau distillée durant 5 min, puis sont acidifiées, au préalable à la contre-coloration à l'aide d'acide acétique à 0,5 % (SIGMA®) durant 5 min. La contre-coloration est effectuée à l'aide de crésyl violet 0,5 % (SIGMA®) pendant 40 s. Les lames sont rincées 5 min dans de l'eau distillée avant d'être décolorées dans de l'éthanol 95°. L'intensité de décoloration est contrôlée sous microscopie. Les lames sont ensuite déshydratées par 2 bains d'alcool à 100° pendant 5 min puis 3 bains de Neo-Clear® de 5 min chacun avant un montage des coupes entre lames et lamelles dans un milieu de montage (CellPath).

VI.2.2. Comptage de la densité cellulaire

Les cellules sont comptées sur un microscope Leica DMLB. Le comptage est effectué manuellement au grossissement x1000 en immersion et à l'aide d'une grille de comptage. Chaque cellule est comptabilisée et les résultats sont exprimés en nombre de cellules par zone définie. Les régions d'intérêt sont analysées sur plusieurs zones adjacentes et sont les suivantes : le cortex correspondant à la patte avant (16 carrés ou $16 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$), le « genou » du corps calleux (6 carrés ou $6 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$), l'amygdale (9 carrés ou $9 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$), le cortex entorhinal (9 carrés ou $9 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$), l'hippocampe détaillé (le gyrus denté (3 carrés ou $3 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$), la CA1 (2 carrés ou $2 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$), CA2 (2 carrés ou $2 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$), CA3 (2 carrés ou $2 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$) et CA4 (2 carrés ou $2 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$)). Pour chaque zone, les deux côtés du cerveau sont comptés.

VI.2.3. Comptage de la surface cellulaire

La surface cellulaire est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ à partir des images TIFF obtenues. La surface est mesurée sur l'hippocampe et de manière plus détaillée, sur le gyrus denté (50 cellules), la CA1 (20 cellules), la CA2 (20 cellules), la CA3 (20 cellules), la CA4 (20 cellules) des deux côtés du cerveau. La moyenne est effectuée dans chaque zone et les résultats sont exprimés en μm^2 .

VI.3. Echantillons pour les études moléculaires et biochimiques

Après le prélèvement de LCR, une large thoraco-laparotomie est réalisée, permettant ainsi l'accès au cœur. Le ventricule gauche est cathétérisé et l'oreillette droite incisée afin de pouvoir perfuser le rat à l'aide de serum physiologique hépariné. Une fois la perfusion arrêtée, le rat est décapité. La boîte crânienne est ensuite découpée sagittalement afin de prélever le cerveau qui est immédiatement placée dans du serum physiologique froid pour préserver les tissus. Le cervelet est éliminé et les deux hémisphères sont séparés. Chaque hémisphère est disséqué dans le but de récupérer le cortex, le striatum et l'hippocampe. Chaque échantillon est placé dans de l'azote liquide afin de refroidir rapidement les tissus et est conservé à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ en attendant son utilisation.

Lors de l'extraction, l'échantillon est préalablement divisé en deux afin d'obtenir un échantillon pour l'ARN et un échantillon protéique.

VI.3.1. Extraction de l'ARN

Chaque échantillon est placé dans une solution d'Extract-All (Eurobio), avant d'être broyé et homogénéisé grâce à l'ULTRA-TURRAX® (IKA® T10 Basic). Après un temps de repos sur de la glace, l'homogénat obtenu est additionné d'1/6 de chloroforme (SIGMA-ALDRICH®) avant agitation. Ces échantillons sont centrifugés à $15\,000 \text{ g}$ durant 15 min à

4°C et trois phases vont se distinguer. La phase aqueuse supérieure contenant les ARN est récupérée, et est additionnée d'isopropanol (SIGMA®) Volume/Volume. Le mélange est laissé au repos sur de la glace durant 5 min avant une centrifugation à 15 000 *g* pendant 30 min à 4 °C. Cette étape va précipiter l'ARN qui est resolubilisé dans de l'éthanol 70° (FLUKA® Analytical). L'échantillon est de nouveau centrifugé à 15 000 *g* 10 min à 4 °C afin de laver le culot. Celui-ci sèche à l'air libre avant une resolubilisation dans de l'eau pure (Eurobio). L'échantillon est ensuite dosé sur la plate-forme d'interactions moléculaires et d'imagerie cellulaire de l'IMPRT. L'appareil utilisé est le NanoDrop® (labtech.com) et permet de connaître la concentration ainsi que la pureté de l'échantillon par une lecture de la densité optique à 260 nm et 280 nm. Ceux-ci sont conservés à -80 °C en attendant leur utilisation.

VI.3.2. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

Dans un premier temps, l'échantillon va subir l'action d'une enzyme, la DNase qui va dégrader les restes d'ADN prélevés au cours de l'extraction et contaminant l'échantillon. Pour cette étape, 1 µg d'ARN brut est mis en présence d'un mélange réactionnel composé de 1 µL d'enzyme DNase I recombinante (Roche) et de 2,5 µL de Tampon 10 X de l'enzyme (Roche) pour un volume final de 25 µL. Le mélange réactionnel est incubé à 37 °C pendant 40 min, température d'activité de l'enzyme, suivi d'une étape à 75 °C pendant 25 min qui permet l'inactivation de l'enzyme.

Une fois l'échantillon dépourvu de traces d'ADN, une étape de RT-PCR « Reverse Transcriptase PCR » doit être effectuée afin d'obtenir l'ADNc. Pour cette étape, 0,5 µg d'ARN précédemment traité est utilisé. Le mélange réactionnel est constitué de 4 µL de Tampon 5 X (5 X First Strand Buffer, Invitrogen™), 0,5 µL d'enzyme SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen™), 1 µL d'hexamères (Random Primer, Invitrogen™) qui vont se fixer sur l'ARN afin d'amorcer la réaction, 1 µL d'oligodT 0,1 M (Invitrogen™) et 1 µL de nucléotides (dNTP à 10 mM, Invitrogen™) afin de permettre l'élongation des brins pour un volume final de 20 µL. L'étape de RT-PCR se déroule comme suit : 10 min à 24 °C permettant l'hybridation des amorces, 40 min à 50 °C permettant l'élongation de l'ADNc complémentaire, suivi d'une étape de 15 min à 75 °C afin d'inactiver l'enzyme.

Après cette étape, sont additionnés 80 µL d'eau au mélange réactionnel. Cet ADNc constitué se conserve à -80 °C quelques jours.

VI.3.3. PCR en temps réel

La PCR quantitative est basée sur la quantification de l'ADN répliqué en temps réel par la mesure du nombre d'amplicons. Pour cela, lors de la réplication, des sondes SYBR vont se fixer sur l'ADN double-brin permettant l'émission d'une fluorescence qui va être lue

par l'appareil. Une fois un seuil de fluorescence atteint, ce qui correspond à un nombre minimum d'amplicons, le nombre de cycles correspondant est appelé CrossPoint et permet de calculer la quantité d'ADN.

Afin de vérifier la qualité des ADNc, une première amplification par PCR quantitative est effectuée sur un gène de référence la TATA Binding Protein (TBP) dont l'expression ne varie pas dans notre étude. Le mélange réactionnel est constitué de 10 ng d'ADNc (soit 2 μ L), 4 μ L d'eau pure (Eurobio), 2 μ L de Tampon SensiMix™ (BIOLINE), 0,2 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, 0,6 μ L d'Enzyme Mix (BIOLINE), 0,2 μ L de SYBR® Green I et 0,5 μ L de l'amorce sens de la TBP M790 3 μ M (TIB® MOLBIOL) et 0,5 μ L de l'amorce anti-sens de la TBP M957 3 μ M (TIB® MOLBIOL).

Ce mélange réactionnel est transféré dans des capillaires (LightCycler® Capillaries, Roche). Ceux-ci sont centrifugés dans une machine dédiée avant la réaction qui s'effectue dans un thermocycleur LightCycler® Instrument (Roche) selon le cycle suivant 8 min à 95 °C suivi de 50 cycles répétés comme suit : 10 s de dénaturation à 95 °C, 10 s d'hybridation à 60 °C et 10 s d'élongation à 72 °C suivi par une courbe de fusion afin de vérifier la spécificité des produits amplifiés (figure 54).

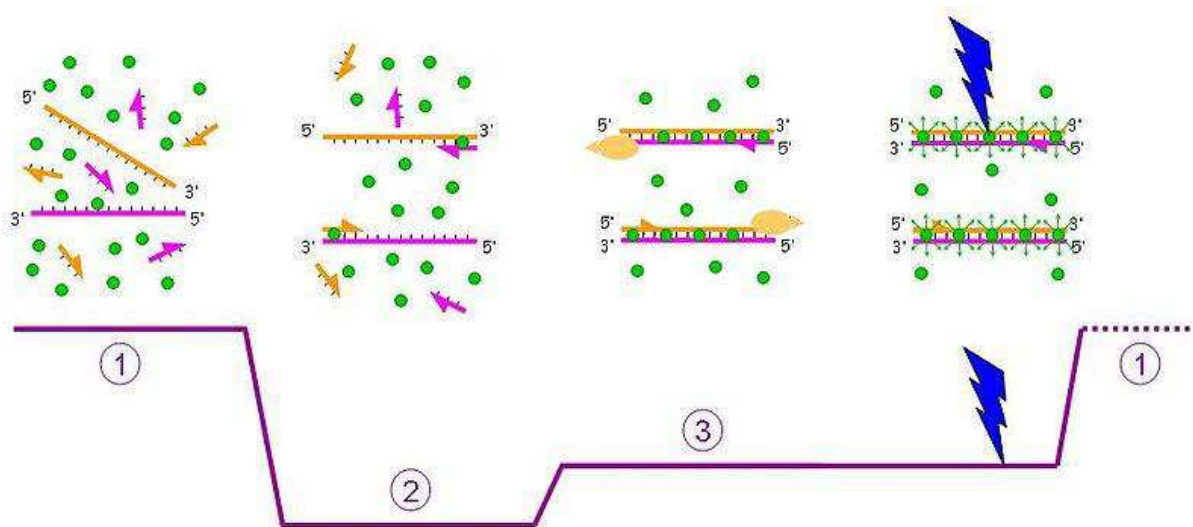


Figure 54 : Schéma du principe de la PCR quantitative

Les échantillons utilisés sont les cortex et hippocampes des deux côtés du cerveau aux temps de reperfusion suivants : 1, 2, 4 et 6 mois. A partir des ADNc sont effectuées des PCR quantitatives (qPCR), afin d'analyser la présence de gènes d'intérêt. Dans notre étude, les gènes utilisés sont le BDNF « Brain-Derived Neurotrophic Factor », et l'APP (tableau 3).

<u>Gènes d'intérêt</u>	<u>Amorces</u>
<i>TBP Up M790</i>	<i>5'-AAGAgAgCCACggACAACtG</i>
<i>TBP Low M957</i>	<i>5'-CCCACCATgTTCTggATCTT</i>
<i>R-APP-Lo</i>	<i>5'-CTCTgTggCCTCTTCgTAgg</i>
<i>R-APP-Up</i>	<i>5'-gCggACACAgACTATgCTgA</i>
<i>BDNF-Up</i>	<i>5'-ACgACgACgTCCCTggCTgA</i>
<i>BDNF-Lo</i>	<i>5'-CACACgCTCAgCTCCCCACg</i>

Tableau 3 : Séquences des amorces utilisées pour étudier les gènes cibles

VI.3.4. Extraction des protéines

L'extraction des protéines est effectuée en parallèle de l'extraction des ARN. Une solution de RIPA additionné d'inhibiteurs de protéases est ajouté à l'échantillon. L'ensemble est broyé à l'aide de l'ULTRA-TURRAX® (IKA® T10 Basic). L'homogénéisation de l'échantillon est vérifiée avant un temps de repos sur la glace durant 30 min. L'échantillon est ensuite centrifugé à 15 000 *g* durant 30 min à 4 °C afin de séparer les protéines cytosoliques des protéines membranaires. Le surnageant est récupéré et constitue les protéines cytosoliques tandis que le culot comprend les protéines membranaires. Les deux types d'échantillons sont conservés à -80 °C en attendant leur utilisation.

VII. Analyse statistique

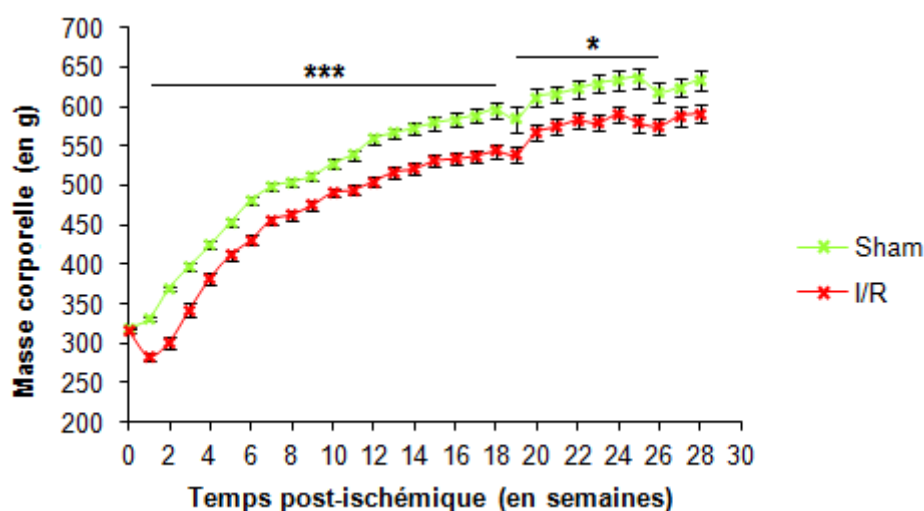
Les résultats sont exprimés en moyennes ou pourcentages \pm erreur standard à la moyenne. Les comparaisons de moyennes ont été effectuées par une analyse de variance (ANOVA) suivie, en cas de différence significative, d'une analyse post-hoc par le test PLSD « Protected Least Significant Difference » de Fisher. Le seuil de significativité pour les tests statistiques était de 5 % ($p < 0,05$).

Résultats

I. Suivi des animaux

I.1. Evolution de la masse corporelle

La masse corporelle des animaux est suivie du jour de l'opération jusqu'à leur sacrifice, à raison d'une pesée par semaine afin d'examiner si l'ischémie cérébrale a un effet sur la prise de poids. Les courbes de poids représentées ci-dessous (figure 55) révèlent un poids statistiquement similaire le jour de l'opération (rats sham 319 ± 2 g Min : 287 g ; Max : 353 g ; rats I/R 316 ± 2 g Min : 278 g ; Max : 350 g). Les rats ischémiés perdent ensuite du poids dans la première semaine qui suit l'ischémie-reperfusion (330 ± 3 g vs 283 ± 5 g *** p<0,000). Au cours des 6 mois de l'étude, la cinétique d'évolution de la masse corporelle des deux groupes est identique mais l'écart initial n'est pas compensé et le poids des animaux ischémiés reste statistiquement inférieur (***) au poids des animaux sham. Jusqu'à la 26^{ème} semaine après l'opération, cette différence demeure significative (* p<0,05).



	Semaine 0	Semaine 4	Semaine 9	Semaine 13	Semaine 17	Semaine 22	Semaine 28
Sham	n=81	n=81	n=62	n=43	n=42	n=29	n=29
I/R	n=94	n=83	n=67	n=52	n=52	n=38	n=33

Figure 55 : Evolution de la masse corporelle et tableau des effectifs des deux groupes de rats au cours du temps. * p<0,05 vs groupe sham ; *** p<0,000 vs groupe sham

I.2. Bilan des opérations

496 rats ont été nécessaires à l'ensemble de cette étude. Parmi ceux-ci, 30,85 % d'entre eux sont décédés au cours de ce travail selon la répartition temporelle suivante (figure 56). La majeure partie des rats (74,51 %) décède dans les premières 24 heures avant d'avoir pu réaliser une IRM. 10,46 % des rats décèdent à 24 heures de reperfusion. Le pourcentage de rats qui décèdent à des temps supérieurs reste minoritaire. Les rats décédés au-delà de 1 mois de post-ischémie appartiennent au groupe des rats sham.

Parmi les rats décédés, 11 d'entre eux sont morts au cours de l'examen par IRM, 4 avant la fin de l'acquisition, sans imagerie disponible au lendemain de l'opération. 6 sont décédés à 24 heures après l'acquisition IRM, durant la période de réveil et 1 rat est décédé à 7 jours de reperfusion, également durant la période de réveil qui suit l'acquisition des images.

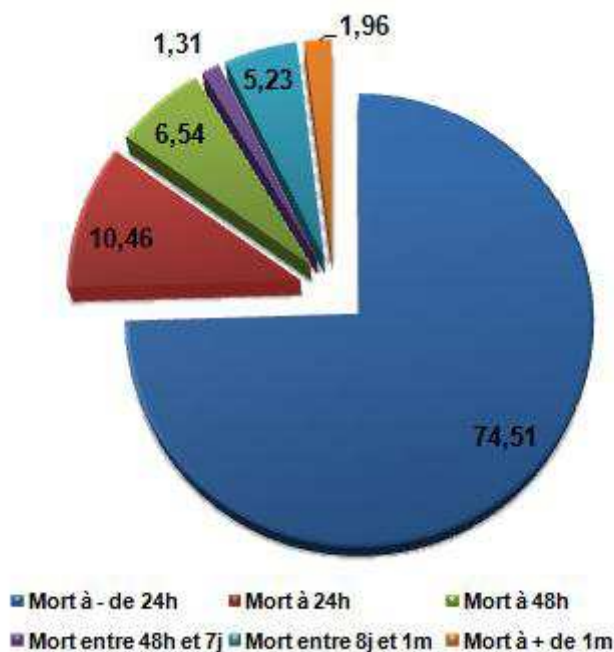


Figure 56 : Diagramme représentant la répartition temporelle des rats décédés au cours de l'étude. Mort à - de 24h : n=114 ; mort à 24h : n=16 ; mort à 48h : n=10 ; mort entre 48h et 7j : n=2 ; mort entre 8j et 1m : n=8 ; mort à + de 1m : n=3

L'IRM réalisée à 24 heures permet de déterminer la nature et la localisation de l'ischémie cérébrale. Sur les rats ayant subi ce premier examen, 42,86 % ont une ischémie à la fois corticale et sous-corticale et ces rats sont inclus dans l'étude. 29,27 % présentent une ischémie ayant une localisation uniquement sous-corticale et 27,87 % ont une ischémie touchant un autre territoire que celui irrigué par l'artère cérébrale moyenne. Ces deux derniers groupes sont exclus de l'étude.

II. Suivi des lésions par IRM

II.1. Evolution de l'infarctus total

L'IRM permet un suivi *in vivo* des lésions grâce à la séquence anatomique T2. L'étude de l'infarctus total à un stade précoce met en évidence une baisse significative (***) $p < 0,000$ du volume de $253,04 \pm 17,06 \text{ mm}^3$ à 24 heures à $140,49 \pm 13,23 \text{ mm}^3$ à 7 jours de reperfusion (figure 57). Cette observation est valable pour la composante corticale et sous-corticale. Le volume de l'œdème à 24 heures est de $94,31 \pm 7,63 \text{ mm}^3$, il diminue très

significativement (***) $p < 0,000$) durant la première semaine pour atteindre un volume de $9,68 \pm 2,94 \text{ mm}^3$ à 7 jours.

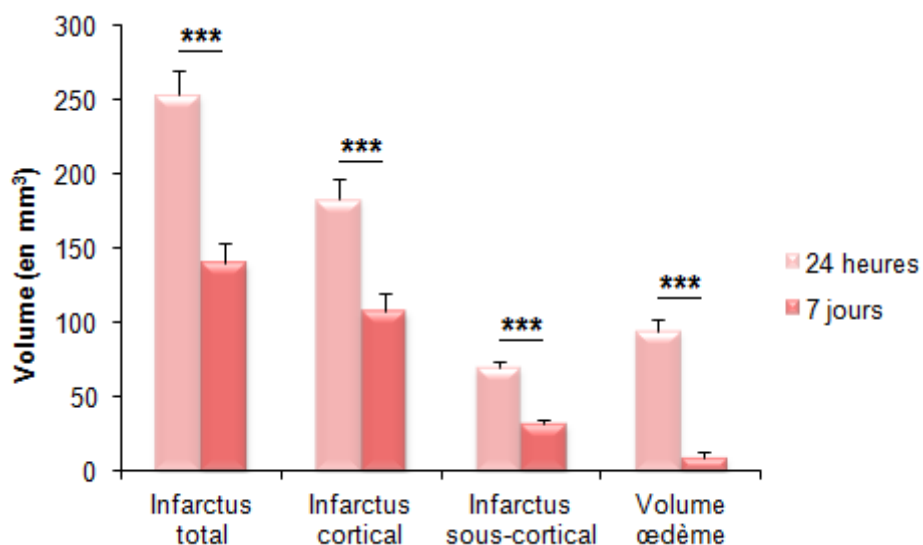


Figure 57 : Volume de l'infarctus total (avec les composantes corticales et sous-corticales) et de l'œdème au cours de la première semaine de reperfusion. 24 heures n=86 ; 7 jours n=64. *** $p < 0,000$ vs groupe 24 heures

Le suivi de la lésion totale a été conduit sur toute l'étude. Ce volume comprend la composante corticale et sous-corticale, et toutes les zones lésées au sein du tissu cérébral : l'hyposignal, l'hypersignal et la cavité porencéphalique.

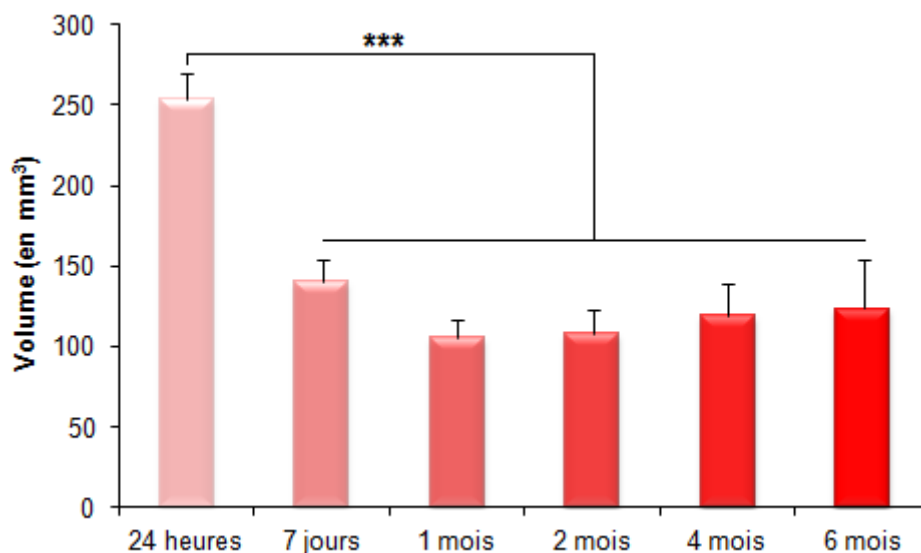


Figure 58 : Volume de l'infarctus total suivi par séquence anatomique T2 au cours de l'étude. 24 heures n=86 ; 7 jours n=64 ; 1 mois n=57 ; 2 mois n=43 ; 4 mois n=29 ; 6 mois n=15. *** $p < 0,000$ vs 24 heures

L'examen du volume lésionnel met en évidence une diminution significative (***) $p < 0,000$) entre 24 heures et 7 jours comme décrit précédemment. Par la suite, celui-ci se

stabilise entre 7 jours et 6 mois de post-ischémie avec des valeurs allant entre $140,49 \pm 13,23 \text{ mm}^3$ à 7 jours et $123,85 \pm 30,81 \text{ mm}^3$ à 6 mois (figure 58).

L'étude plus approfondie de ces résultats permet de mettre en évidence une relation de cause à effet puisqu'il existe une corrélation positive significative (***) entre le volume de la lésion totale à 24 heures et le volume de la lésion totale à 6 mois de post-ischémie (figure 59A).

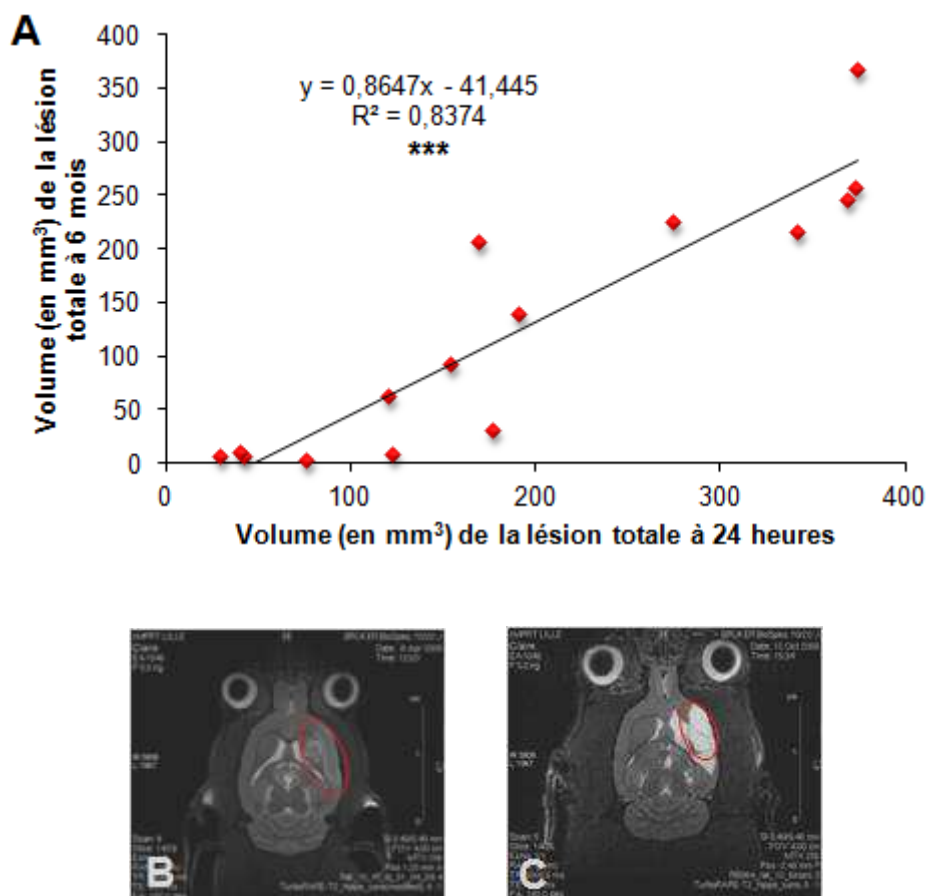


Figure 59 : Corrélation positive entre le volume de la lésion totale à 24 heures et le volume de la lésion totale à 6 mois (A), Plan de coupe sagittale en séquence anatomique T2 d'un rat ischemié à 24 heures de reperfusion mettant en évidence la lésion totale (cercle rouge) (B), Plan de coupe sagittale en séquence anatomique T2 d'un rat ischemié à 6 mois de post-ischémie mettant en évidence la lésion totale (cercle rouge) (C). *** $p < 0,000$ vs groupe 24 heures.

La lésion à 24 heures de reperfusion apparaît comme un signal unique en séquence T2 (figure 59B). La lésion totale à 6 mois de post-ischémie apparaît plus complexe puisqu'elle est composée de plusieurs types de signaux (figure 59C).

II.2. Evolution des autres types de lésions

La lésion ischemique est complexe et apparaît sous différentes formes lors de la séquence anatomique T2 de l'imagerie IRM. Les différents types de signaux observés ont leur propre cinétique d'évolution.

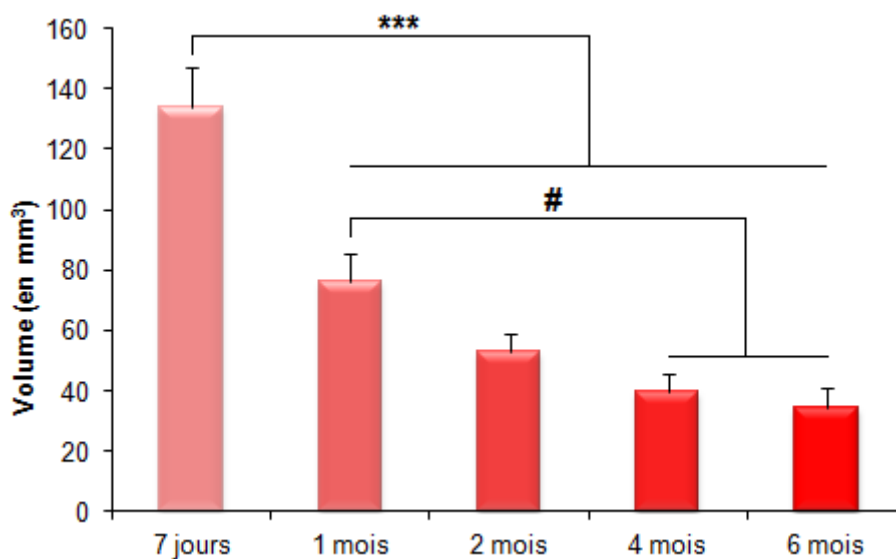


Figure 60 : Evolution du volume de l'hyper signal au cours du temps. 7 jours n=64 ; 1 mois n=57 ; 2 mois n=43 ; 4 mois n=29 ; 6 mois n=15. *** p<0,000 vs groupe 7 jours, # p<0,05 vs groupe 1 mois

A 7 jours de reperfusion, la lésion ischémique se différencie et l'hyper signal (visualisé par un signal dans les tons blancs sur la séquence T2, reflet d'un tissu plus lâche) apparaît et représente un volume de $134,18 \pm 12,99 \text{ mm}^3$ (figure 60). Ce volume diminue de manière significative durant les mois qui suivent pour atteindre un volume de $34,28 \pm 6,94 \text{ mm}^3$ à 6 mois de post-ischémie (**p<0,000). Cette diminution est très progressive puisque le volume observé à 1 mois de post-ischémie ($76,54 \pm 8,73 \text{ mm}^3$) est significativement différent (# p<0,05) des volumes observés à 4 et 6 mois de post-ischémie (respectivement $39,61 \pm 5,96 \text{ mm}^3$ et $34,28 \pm 6,94 \text{ mm}^3$).

Dès 1 mois après l'opération, le tissu situé au cœur de l'infarctus a subi des dommages irréversibles et se nécrose peu à peu (figure 61B et 61C). A la place, les cavités néoformées se remplissent peu à peu de LCR visible par un signal blanc en séquence T2 (figure 61A).



Figure 61 : (A) Plan de coupe sagittale en séquence anatomique T2 d'un rat ischémié à 6 mois de post-ischémie mettant en évidence la lésion totale, (B) Photo de cerveau d'un rat ischémié présentant une cavité porencéphalique, (C) Coupe de rat colorée au Crésyl violet/Luxol Fast Blue.

La croissance de ces cavités dites porencéphaliques continue le long de l'étude et le suivi à l'IRM permet de suivre leur volume au cours du temps (figure 62). A 1 mois de post-ischémie, le volume atteint $18,79 \pm 3,64 \text{ mm}^3$ et croît de façon significative pour atteindre $49,12 \pm 9,19 \text{ mm}^3$ à 2 mois (* $p < 0,05$) puis $86,04 \pm 25,08 \text{ mm}^3$ à 6 mois de post-ischémie (** $p < 0,000$). L'augmentation est progressive avec un volume significativement différent entre 2 et 6 mois de post-ischémie (# $p < 0,05$).

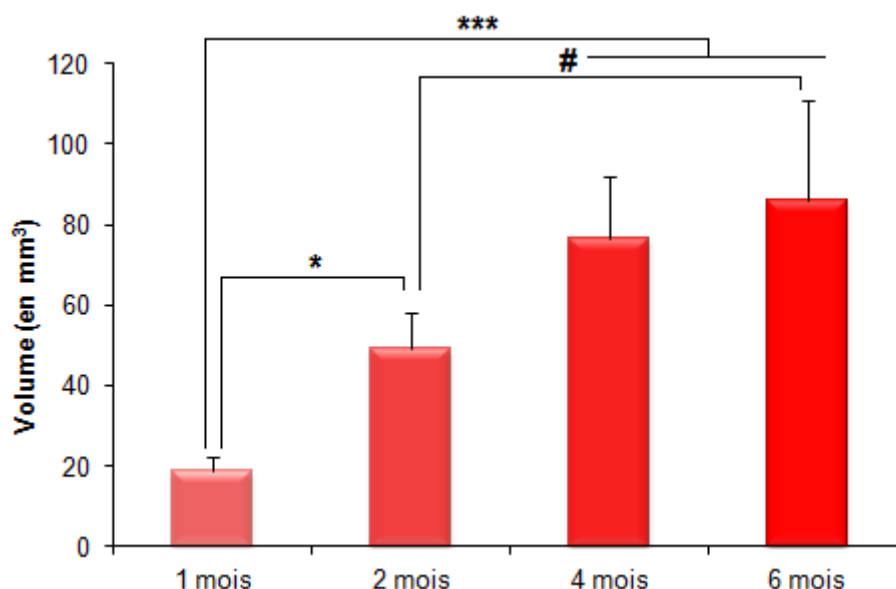


Figure 62 : Evolution du volume des cavités porencéphaliques au cours du temps. 1 mois n=57 ; 2 mois n=43 ; 4 mois n=29 ; 6 mois n=15. * $p < 0,05$ vs groupe 1 mois, ** $p < 0,000$ vs groupe 1 mois, # $p < 0,05$ vs groupe 2 mois

Dès 1 mois de post-ischémie, 56 % des rats développent des cavités porencéphaliques (tableau 4). Ce pourcentage augmente à 2 mois de post-ischémie, se stabilise à 72 % avant de connaître une décroissance à 6 mois probablement suite à l'effectif moins important à 6 mois de post-ischémie.

1 mois	2 mois	4 mois	6 mois
56,1 %	72,1 %	72,4 %	66,7 %

Tableau 4 : Pourcentage de rats développant des cavités porencéphaliques

Le volume de la cavité porencéphalique est prédictible dès 24 heures de reperfusion puisqu'il existe une corrélation positive entre le volume de la lésion totale à 24 heures et le volume des cavités porencéphaliques à 6 mois (** $p < 0,000$) (figure 63).

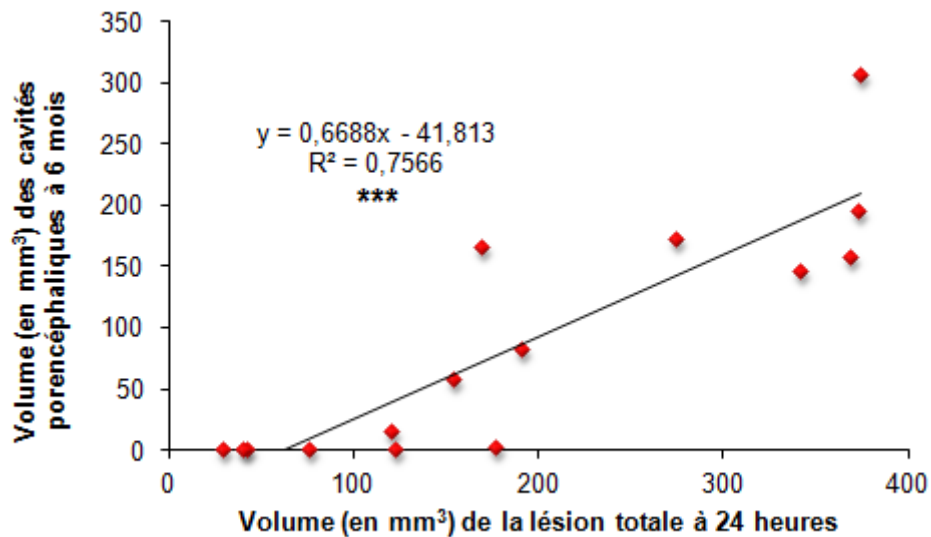


Figure 63 : Corrélation positive entre le volume de la lésion totale à 24 heures et le volume des cavités porencéphaliques à 6 mois

La localisation de la genèse des cavités porencéphaliques s’effectue au sein de la lésion apparaissant en hypersignal et leurs cinétiques d’évolution sont inverses. A 7 jours de reperfusion, seul apparaît l’hypersignal et son volume est significativement différent (* $p < 0,05$) en comparaison au cumul de lésions à 1 mois ($134,18 \pm 12,99 \text{ mm}^3$ vs $95,33 \pm 11,28 \text{ mm}^3$).

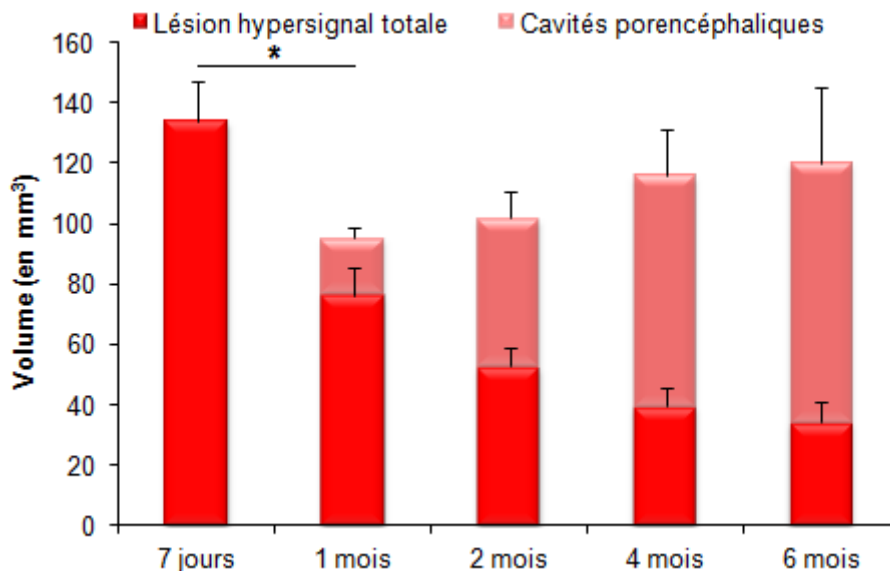


Figure 64 : Evolution du volume des cavités porencéphaliques au sein de la région touchée par l'hypersignal. 7 jours n=64 ; 1 mois n=57 ; 2 mois n=43 ; 4 mois n=29 ; 6 mois n=15. * $p < 0,05$ vs groupe 7 jours

En observant les plans de coupe en séquence anatomique T2, il apparaît que la cavité remplace peu à peu l’hypersignal tandis que le volume de la région initialement touchée n’évolue plus (figure 64). A 1 mois de post-ischémie, l’hypersignal représente un

volume de $76,54 \pm 8,73 \text{ mm}^3$ tandis que la cavité représente $18,79 \pm 3,64 \text{ mm}^3$. A 6 mois de post-ischémie, l'hypersignal a un volume de $34,28 \pm 6,94 \text{ mm}^3$ tandis que la cavité porencéphalique représente un volume de $86,04 \pm 25,08 \text{ mm}^3$.

Sur ces mêmes plans de coupe en séquence anatomique T2, un autre type de lésion apparaît au décours d'une ischémie visualisé sous forme d'hyposignal (représenté par un signal dans les tons noirs sur la séquence T2 et reflet d'un tissu plus dense) (figure 65B).

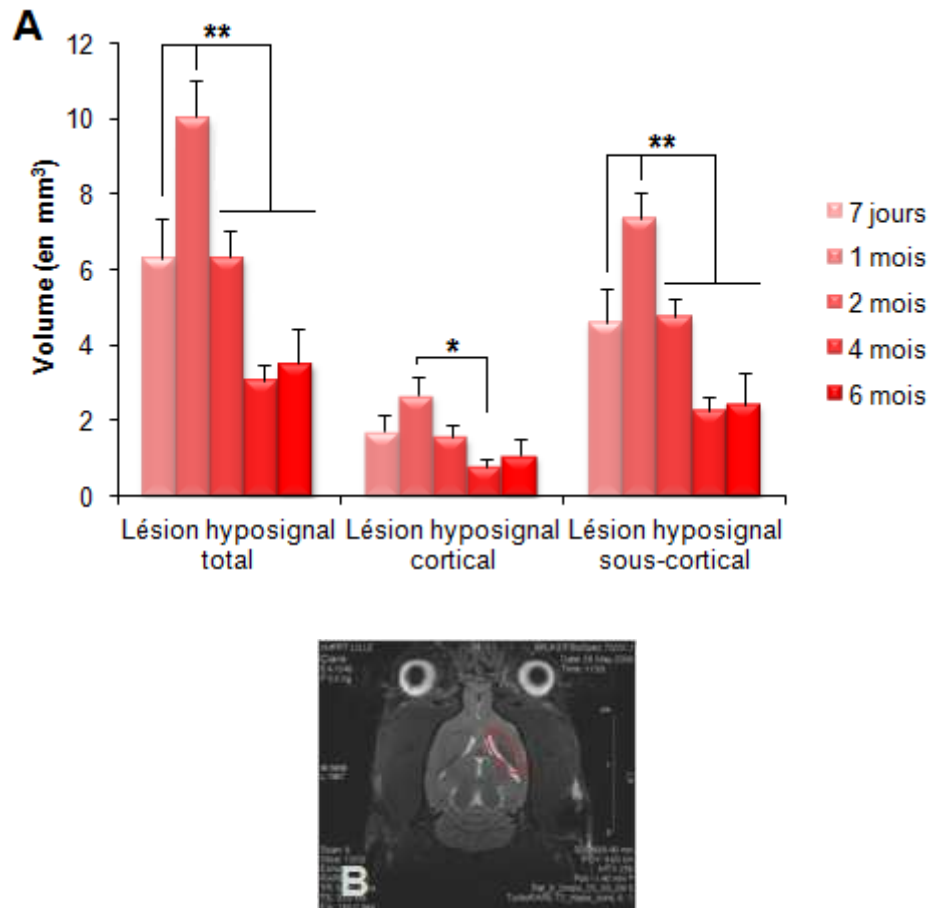


Figure 65 : (A) Evolution de la cinétique du volume de l'hyposignal au cours du temps, (B) Plan de coupe sagittale en séquence anatomique T2 d'un rat ischémié à 6 mois de post-ischémie mettant en évidence la lésion en hyposignal. 7 jours n=64 ; 1 mois n=57 ; 2 mois n=43 ; 4 mois n=29 ; 6 mois n=15, ** p<0,005 vs groupe 1 mois

Celui-ci représente un volume moindre en comparaison à l'hypersignal et apparaît avec une cinétique particulière (figure 65A). A 7 jours de reperfusion, son volume est de $6,31 \pm 1,06 \text{ mm}^3$. Il croît de façon significative (** p<0,005) jusqu'à 1 mois de post-ischémie avec un pic de $10,05 \pm 0,98 \text{ mm}^3$ puis décroît rapidement durant le mois suivant pour atteindre un volume de $6,34 \pm 0,70 \text{ mm}^3$ et se stabilise à 4 mois de post-ischémie avec un volume de $3,06 \pm 0,43 \text{ mm}^3$ qui est significativement différent par rapport à 7 jours (non noté p<0,05), 1 mois (***) p<0,000) et 2 mois (non noté p<0,05). Ce signal est quantifié à la fois au

niveau cortical et sous-cortical et la même cinétique d'apparition est observée dans ces composantes.

7 jours	1 mois	2 mois	4 mois	6 mois
93,8 %	100,0 %	100,0 %	96,6 %	100,0 %

Tableau 5 : Pourcentage de rats développant un hyposignal

Dès 7 jours de reperfusion, 93,8 % des rats développent un hyposignal (tableau 5). A partir de 1 mois de post-ischémie, la totalité de l'effectif présente un hyposignal excepté à 4 mois (1 rat ne présente pas d'hyposignal).

II.3. Evolution des structures anatomiques

La lésion ne constitue pas la seule variable observable à l'IRM, celle-ci provoque de nombreux réarrangements au niveau des structures anatomiques au sein de l'encéphale.

Le volume du cerveau a été mesuré au cours du temps chez les rats sham et ischémiés-reperfusés (figure 66).

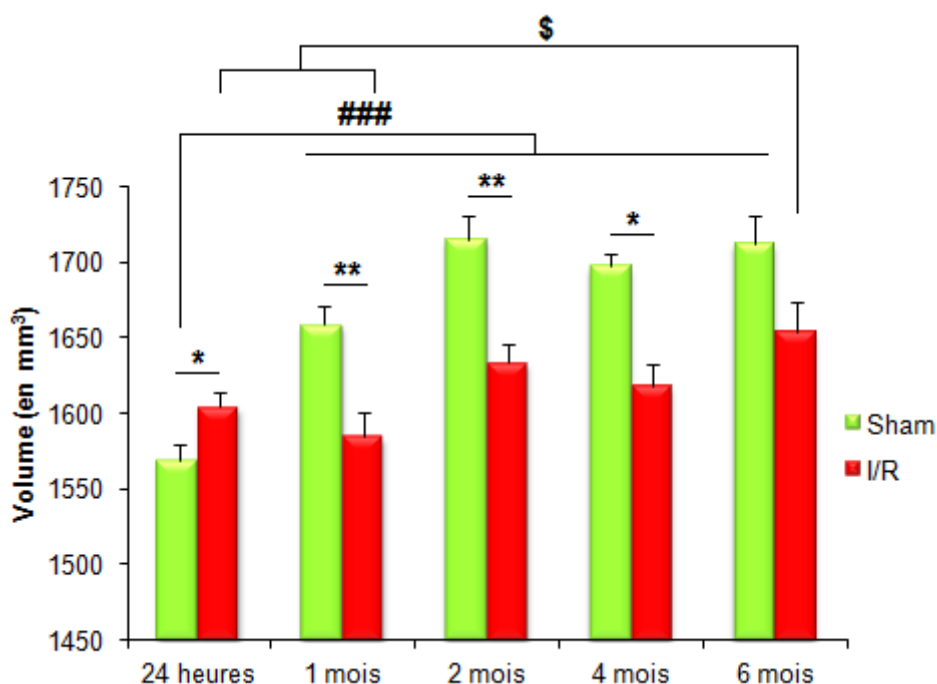


Figure 66 : Evolution du volume des cerveaux des deux groupes de rats au cours du temps. Sham 24h n=55 ; I/R 24h n=69 ; Sham 1m n=12 ; I/R 1m n=53 ; Sham 2m n=16 ; I/R 2m n=41 ; Sham 4m n=11 ; I/R 4m n=28 ; Sham 6m n=16 ; I/R 6m n=14. * p<0,05 vs groupe sham, ** p<0,005 vs groupe sham, ### p<0,000 vs groupe sham 24 heures, \$ p<0,05 vs groupe I/R 6 mois.

Les résultats démontrent une croissance du volume du cerveau chez les rats sham jusqu'à 2 mois de post-ischémie soit environ 5 mois de la vie de l'animal pour atteindre un volume de $1713 \pm 19 \text{ mm}^3$ qui reste stable (### p<0,000). Les résultats chez les rats ischémiés mettent en évidence plusieurs observations. A 24 heures, la hausse observée

(1604 ± 10 mm³) est significative et reflète la présence de l'œdème suite à l'opération en comparaison aux rats sham (1569 ± 10 mm³) (* p<0,05). Entre 24 heures et 1 mois, le volume des cerveaux des rats ischémiés se stabilise puis augmente par la suite pour se stabiliser à 2 mois de post-ischémie (1634 ± 12 mm³) et atteindre un volume de 1654 ± 19 mm³ à 6 mois de post-ischémie (§ p<0,05). A partir de 1 mois de post-ischémie, le cerveau des rats ischémiés a un volume significativement inférieur (** p<0,005) à celui des rats sham jusque 4 mois de post-ischémie (* p<0,05), cette tendance à 6 mois de post-ischémie n'est plus statistiquement significative.

Le volume de chaque hémisphère contro- et ipsilatéral a été également quantifié au sein des deux groupes de rats. (figure 67).

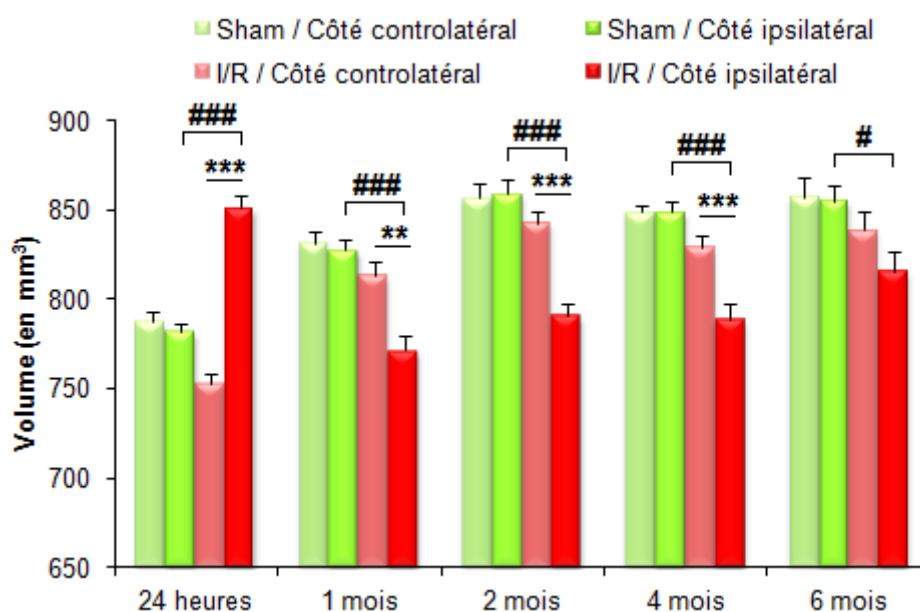


Figure 67 : Evolution du volume des hémisphères des deux groupes de rats au cours du temps. Sham 24h n=55 ; I/R 24h n=69 ; Sham 1m n=12 ; I/R 1m n=53 ; Sham 2m n=16 ; I/R 2m n=41 ; Sham 4m n=11 ; I/R 4m n=28 ; Sham 6m n=16 ; I/R 6m n=14. ** p<0,005 vs groupe I/R controlatéral, *** p<0,000 vs groupe I/R controlatéral, # p<0,05 vs groupe sham, ### p<0,000 vs groupe sham ipsilatéral.

Chez les rats sham, il n'apparaît pas de différence entre le volume des deux hémisphères. Au niveau du groupe I/R, le volume de l'hémisphère controlatéral diminue à 24 heures suite à la présence de l'œdème du côté ipsilatéral (*** p<0,000). Par la suite, ce volume est similaire à celui de l'hémisphère controlatéral des rats sham. Au cours de la période d'étude, les deux hémisphères chez les rats sham et l'hémisphère controlatéral des rats ischémiés évoluent de la même manière avec des volumes semblables. Ils croissent entre 24 heures de reperfusion et 1 mois de post-ischémie de manière significative (non noté p<0,000) puis le volume se stabilise.

Dès 1 mois de post-ischémie, l'hémisphère ipsilatéral des rats ischémiés a un volume significativement réduit (** p<0,005) en comparaison au côté controlatéral. Le volume

étant de $773 \pm 8 \text{ mm}^3$ du côté ipsilatéral versus $815 \pm 8 \text{ mm}^3$ du côté controlatéral à 1 mois de post-ischémie. Cette différence est observée jusque 4 mois de post-ischémie (** $p < 0,000$).

La comparaison entre les deux groupes permet d'affirmer une différence significative quant au volume de l'hémisphère ipsilatéral des animaux ischémiés en comparaison aux rats sham durant l'entièreté de l'étude (### $p < 0,000$). Le volume de l'hémisphère ipsilatéral des rats I/R est significativement réduit par rapport au groupe sham excepté à 24 heures de reperfusion où son volume atteint $851 \pm 7 \text{ mm}^3$ suite à la formation de l'œdème ($782 \pm 5 \text{ mm}^3$ chez les rats sham ; ### $p < 0,000$).

Le volume des ventricules (latéraux et 3^{ème} ventricule) n'est pas modifié chez les rats sham au cours du temps (figure 68).

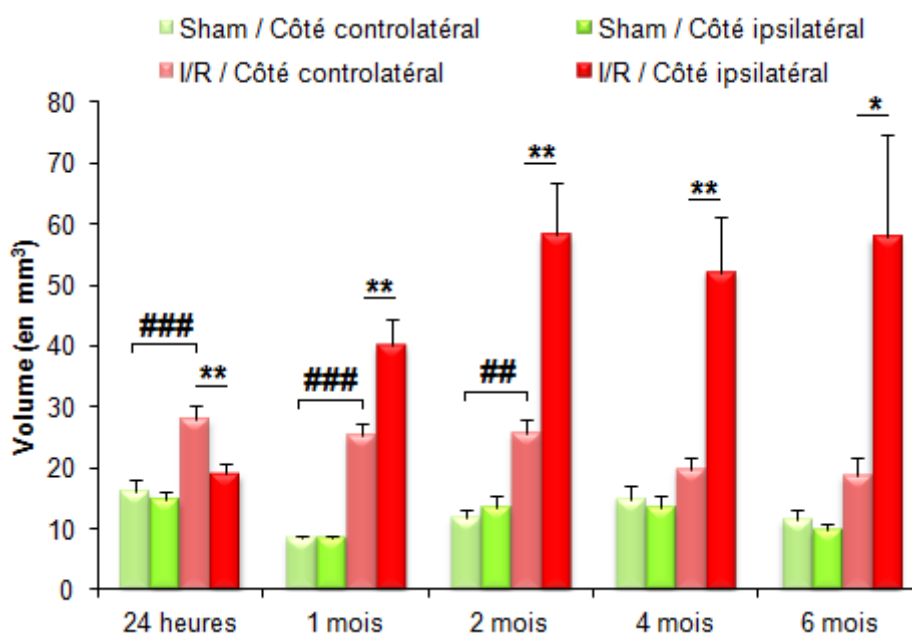


Figure 68 : Evolution du volume des ventricules des deux groupes de rats au cours du temps. Sham 24h n=70 ; I/R 24h n=86 ; Sham 1m n=18 ; I/R 1m n=57 ; Sham 2m n=18 ; I/R 2m n=43 ; Sham 4m n=11 ; I/R 4m n=29 ; Sham 6m n=16 ; I/R 6m n=15. * $p < 0,05$ vs groupe I/R controlatéral, ** $p < 0,005$ vs groupe I/R controlatéral, ## $p < 0,005$ vs groupe Sham/Controlatéral, ### $p < 0,000$ vs groupe Sham/Controlatéral

A l'opposé, le volume des ventricules chez les rats ischémiés varie. Le ventricule controlatéral a un volume supérieur en comparaison aux rats sham durant les 2 premiers mois de l'étude, avec une valeur de $25,68 \pm 2,23 \text{ mm}^3$ chez les rats ischémiés et de $11,84 \pm 1,18 \text{ mm}^3$ au sein du groupe sham à 2 mois de post-ischémie (## $p < 0,005$). Cette tendance n'est plus statistiquement significative par la suite.

Le volume du ventricule ipsilatéral chez les rats ischémiés est significativement supérieur à celui du ventricule controlatéral dès 1 mois de post-ischémie ($40,13 \pm 4,39 \text{ mm}^3$

vs $25,27 \pm 5,41 \text{ mm}^3$, ** $p < 0,005$) et ceci perdure dans le temps puisqu'à 6 mois, le ventricule ipsilatéral atteint un volume de $57,93 \pm 16,68 \text{ mm}^3$ tandis que le ventricule controlatéral a un volume de $18,77 \pm 2,77 \text{ mm}^3$ (* $p < 0,05$).

L'observation détaillée des ventricules ipsilatéraux des deux groupes d'animaux met en évidence plusieurs différences (figure 69). Dès 1 mois de post-ischémie et jusqu'à 6 mois, le volume du ventricule des rats ischémiés est significativement augmenté par rapport aux rats sham avec un volume à 1 mois de $40,13 \pm 4,39 \text{ mm}^3$ par rapport à un volume de $8,65 \pm 0,34 \text{ mm}^3$ chez les rats sham (***) $p < 0,000$).

D'autre part, il y a une augmentation progressive et significative (### $p < 0,000$) du volume du ventricule ipsilatéral au cours du temps avec une stabilisation de ce volume à 2 mois de post-ischémie avec une valeur de 55 mm^3 .

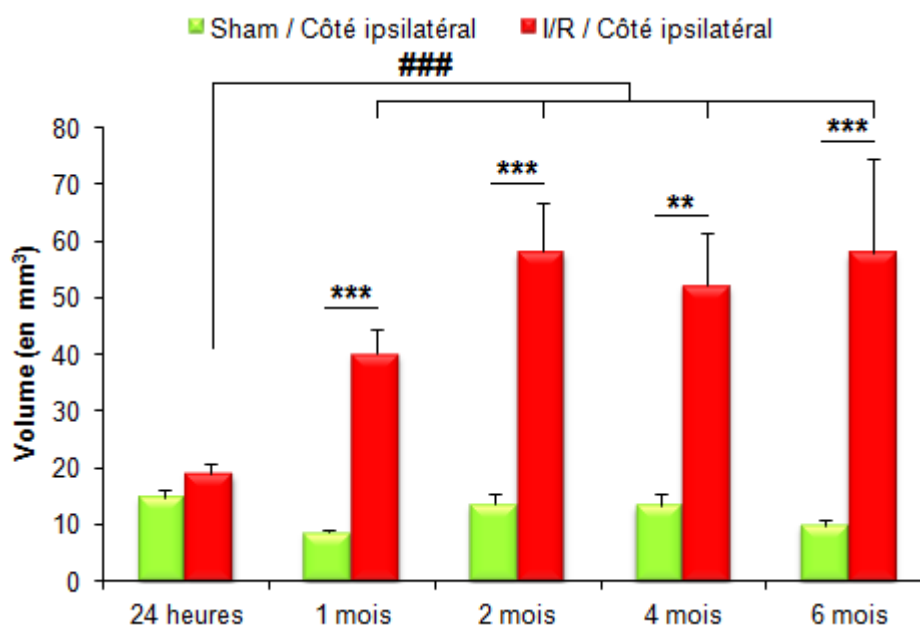


Figure 69 : Evolution du volume du ventricule ipsilatéral des deux groupes de rats au cours du temps. Sham 24h n=70 ; I/R 24h n=86 ; Sham 1m n=18 ; I/R 1m n=57 ; Sham 2m n=18 ; I/R 2m n=43 ; Sham 4m n=11 ; I/R 4m n=29 ; Sham 6m n=16 ; I/R 6m n=15. ** $p < 0,005$ vs groupe sham, *** $p < 0,000$ vs groupe sham, ### $p < 0,000$ vs groupe I/R 24 heures

II.4. Evolution tissulaire dans les régions d'intérêt impliquées dans différentes fonctions comportementales

L'analyse du coefficient d'ADC permet d'obtenir des informations sur le degré de liberté des molécules d'eau au sein du cerveau dans les différentes zones étudiées. Lorsque les deux côtés d'une zone étudiée ont la même qualité tissulaire leur ratio est égal à 1.

Dans notre étude, trois régions d'intérêt impliquées dans les tâches comportementales demandées ont fait l'objet d'un suivi.

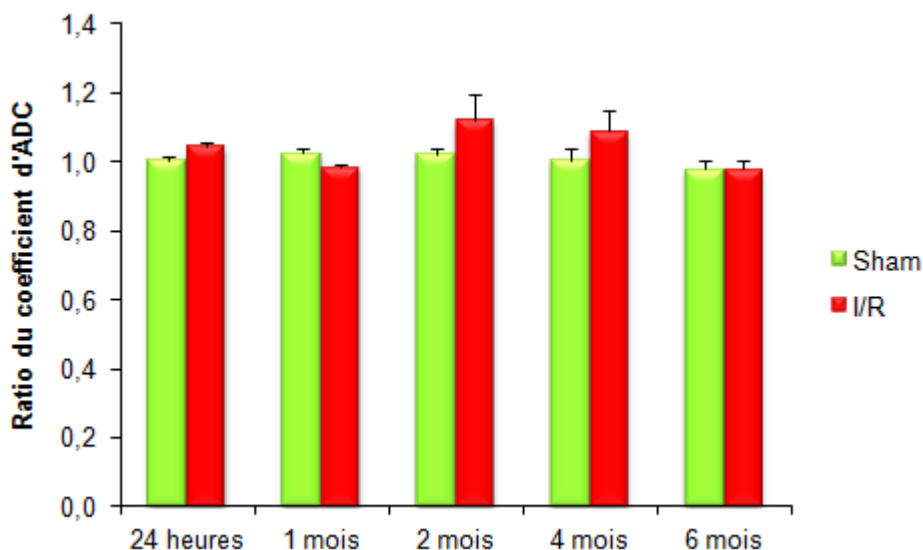


Figure 70 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région du thalamus dans les deux groupes au cours du temps. Sham 24h n=19 ; I/R 24h n=32 ; Sham 1m n=5 ; I/R 1m n=32 ; Sham 2m n=5 ; I/R 2m n=25 ; Sham 4m n=5 ; I/R 4m n=18 ; Sham 6m n=3 ; I/R 6m n=8.

Le thalamus, structure située au niveau de la substance blanche du cerveau, est une composante du circuit de Papez impliquée dans les processus émotionnels notamment liés à la mémorisation. Cet ensemble de noyaux projette également des connexions avec le cortex moteur et perçoit les informations sensorielles (toucher...). Au niveau de cette zone, aucune variation n'est observée dans les deux groupes au cours du temps (figure 70). Les rats sham ont un ratio proche de 1 au cours du temps.

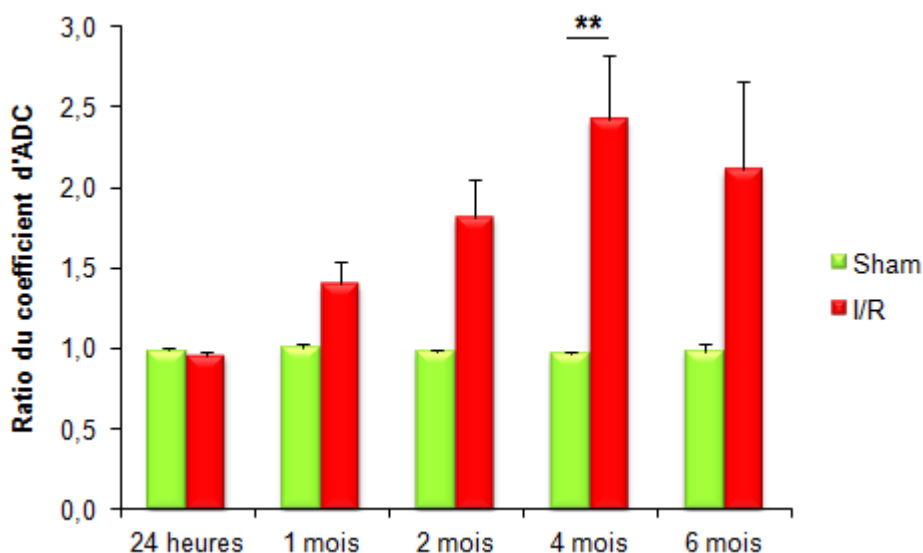


Figure 71 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région du noyau caudé dans les deux groupes au cours du temps. Sham 24h n=19 ; I/R 24h n=32 ; Sham 1m n=5 ; I/R 1m n=32 ; Sham 2m n=5 ; I/R 2m n=25 ; Sham 4m n=5 ; I/R 4m n=18 ; Sham 6m n=3 ; I/R 6m n=8. ** p<0,005 vs groupe sham

Le noyau caudé fait partie des ganglions de la base, et participe donc à l'intégration de toutes les informations avant de projeter des afférences vers le thalamus qui relayera les informations au cortex. Le noyau caudé est initialement touché par l'ischémie, l'ADC augmente de manière graduelle de 1 mois de post-ischémie ($1,41 \pm 0,13$; $p=0,051$) à 6 mois de post-ischémie ($2,11 \pm 0,55$; $p=0,069$) (figure 71). A 4 mois de post-ischémie, la différence de ratio est significative (** $p<0,005$) entre le groupe sham et le groupe ischémié signifiant un tissu plus lâche du côté ipsilatéral chez les rats ischémiés, les ratios sont respectivement de $0,97 \pm 0,01$ et de $2,43 \pm 0,39$. Les rats sham ont quant à eux, un ratio ADC proche de 1 témoignant d'un tissu sain et qui ne varie pas au cours du temps.

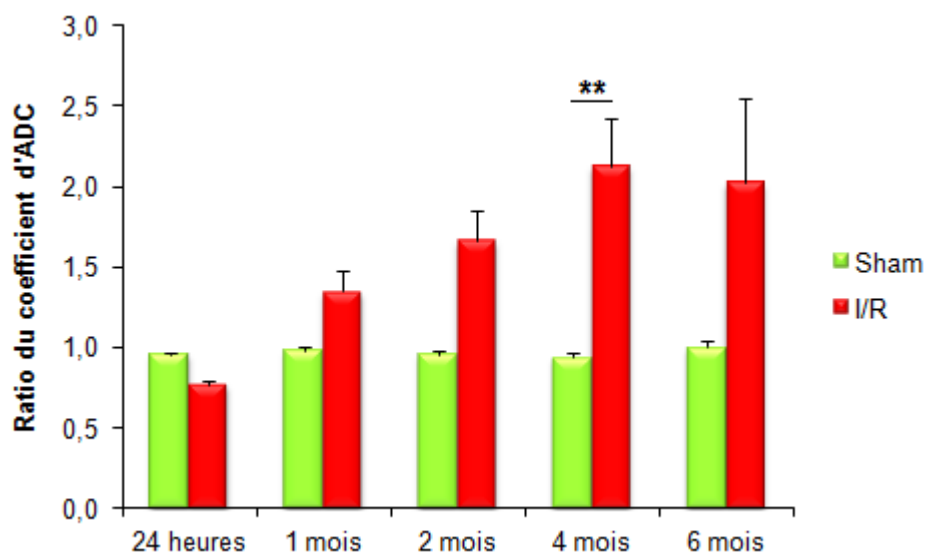


Figure 72 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région du cortex pariétal dans les deux groupes au cours du temps. Sham 24h n=19 ; I/R 24h n=30 ; Sham 1m n=5 ; I/R 1m n=32 ; Sham 2m n=5 ; I/R 2m n=25 ; Sham 4m n=5 ; I/R 4m n=18 ; Sham 6m n=3 ; I/R 6m n=8. ** $p<0,005$ vs groupe sham

Le cortex pariétal est une zone qui intervient dans le déroulement des mouvements moteurs, dans l'intégration des informations visuelles ou encore dans l'attention. Cette zone est particulièrement touchée par l'ischémie, ce qui explique le ratio diminué à 24 heures ($0,77 \pm 0,03$ vs $0,96 \pm 0,01$). Dès 1 mois de post-ischémie et tout au long de l'étude, le ratio d'ADC augmente en comparaison au groupe sham. Il est à 1 mois de $1,35 \pm 0,13$ ($p=0,051$) et à 6 mois de $2,03 \pm 0,53$ ($p=0,069$). Cependant, aucune différence statistique n'apparaît entre les deux groupes excepté à 4 mois de post-ischémie (** $p<0,005$). Les rats sham montrent un ratio stable au cours du temps de l'ordre de 1 (figure 72).

II.5. Evolution de la quantité de fer

La séquence SWI permet d'observer la quantité de fer présente au sein du cerveau. Dès 7 jours de reperfusion, concomitante à l'apparition de l'hyposignal au sein de la lésion, le fer s'accumule au sein du cerveau des rats ischémiés (tableau 6). Au fur et à mesure du

temps, le fer est décelable chez les rats I/R en comparaison aux rats sham dès 1 mois de post-ischémie (** $p < 0,000$) excepté à 2 mois de post-ischémie. De plus, la quantité présente chez les rats I/R de 1 à 6 mois de post-ischémie est significativement différente par rapport au groupe I/R à 7 jours de reperfusion (#### $p < 0,000$).

	24 heures		7 jours		1 mois		2 mois		4 mois		6 mois	
	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R
Nombre de rats	n=11	n=22	n=11	n=22	n=10	n=23	n=2	n=31	n=11	n=18	n=10	n=24
Score d'intensité de présence du fer	0,000 ± 0,000	0,136 ± 0,075	0,091 ± 0,091	0,818 ± 0,182	0,300 ± 0,153	2,478 ± 0,242 ***,###	1,000 ± 0,000	1,968 ± 0,280 ###	0,182 ± 0,122	2,278 ± 0,321 ***,###	0,200 ± 0,133	2,167 ± 0,280 ***,###

Tableau 6 : Score d'intensité de la présence de Fer au sein des cerveaux. *** $p < 0,000$ vs groupe sham, ### $p < 0,000$ vs groupe I/R 7 jours

L'étude comparée des séquences anatomiques T2 et de la SWI permet de corréler la visualisation de l'hyposignal avec celui du fer. Chez les rats sham, il y a très peu de présence de fer au sein du cerveau (figure 73A, 73B & 73C, panel de gauche).

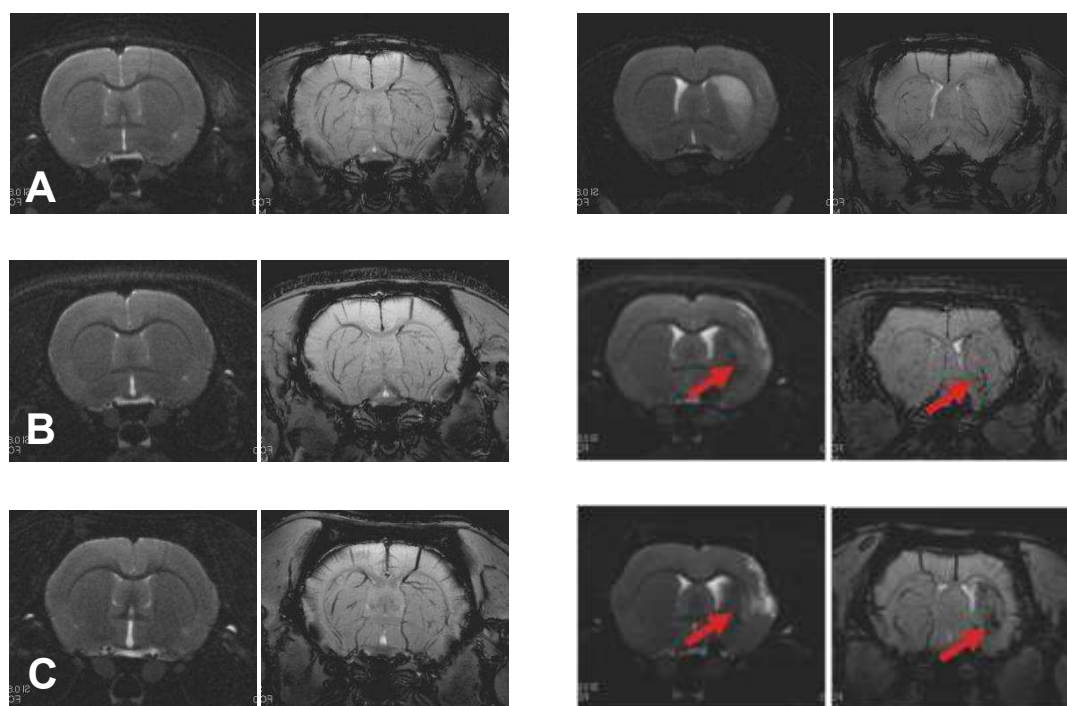


Figure 73 : Comparaison des séquences en IRM, avec la séquence anatomique T2 et la séquence SWI au sein des rats sham (à gauche) et ischemiés (à droite) à plusieurs temps de post-ischémies (A) à 24 heures de reperfusion, (B) à 1 mois de post-ischémie et (C) à 6 mois de post-ischémie. Les flèches rouges mettent en évidence l'hyposignal et le fer chez les rats I/R.

Chez les rats ischemiés, à 24 heures de reperfusion, aucune présence de fer n'est détectée par l'imagerie (figure 73A, panel de droite). A 1 mois de post-ischémie, la présence est décelable en majorité au niveau striatal et le signal est très proche de l'hyposignal (figure 73B, panel de droite). A 6 mois de post-ischémie, la présence de fer est encore plus marquée au sein de la lésion striatale (figure 73C, panel de droite).

La présence de fer est visible au sein du cortex avec une prévalence plus faible. Cependant, les rats développant des cavités porencéphaliques volumineuses ne présentent pas d'accumulation de fer suite à la nécrose du tissu.

III. Conséquences motrices de l'ischémie-reperfusion

III.1. Etude comportementale

III.1.1. Motricité générale

L'actimétrie permet d'examiner le comportement locomoteur spontané des animaux. Les résultats mettent en évidence chez les rats ischémiés une baisse significative à 1 mois de post-ischémie de la distance totale parcourue dans l'arène (figure 74). Les rats sham parcourent 4150 ± 984 mm en 10 min tandis que les rats ischémiés parcourent 3279 ± 892 mm reflétant une hypoactivité de ces derniers (** $p < 0,005$). A l'inverse, à 6 mois de post-ischémie, les rats ischémiés présentent une hyperactivité qui se traduit par une distance parcourue de 2900 ± 934 mm tandis que les rats sham parcourent seulement 2290 ± 561 mm (* $p < 0,05$).

Au cours du temps, la distance totale parcourue par les rats ischémiés ne varie pas. Chez les rats sham, ce même paramètre varie statistiquement au cours du temps. La distance parcourue diminue dans ce groupe passant de 4150 ± 984 mm à 1 mois de post-ischémie à 3559 ± 773 mm à 2 mois ($p < 0,05$ vs 1 mois) puis à 2812 ± 618 mm à 4 mois ($p < 0,000$ vs 1 mois) et 2290 ± 561 mm à 6 mois ($p < 0,000$ vs 1 mois).

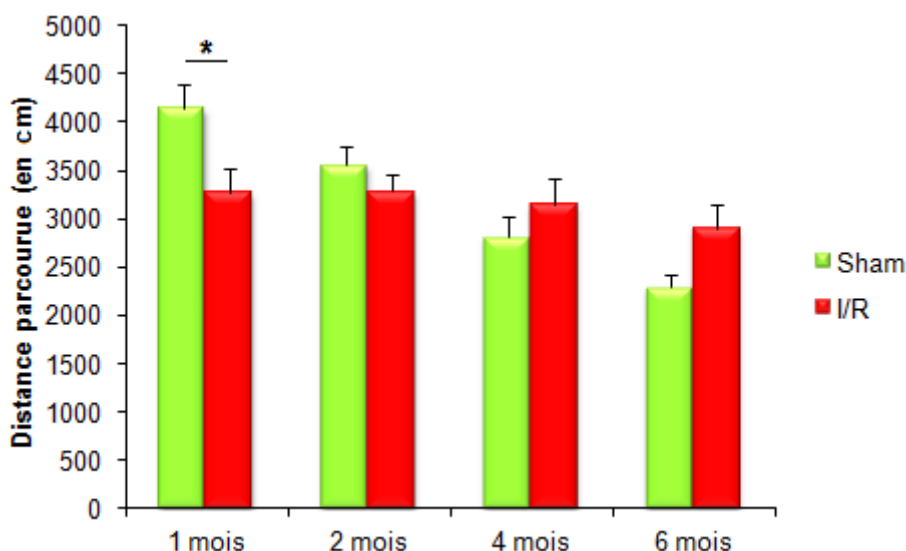


Figure 74 : Distance totale parcourue en 10 min par les deux groupes de rats dans le test de l'actimètre au cours du temps. Sham 1m n=18 ; I/R 1m n=13 ; Sham 2m n=17 ; I/R 2m n=14 ; Sham 4m n=9 ; I/R 4m n=14 ; Sham 6m n=16 ; I/R 6m n=15. * $p < 0,05$ vs groupe sham, ** $p < 0,005$ vs groupe sham

D'autres paramètres ont été mesurés dans ce test de l'actimétrie (tableau 7). Le temps d'inactivité des animaux ne diffère pas entre les deux groupes mais augmente

progressivement au cours du temps dans les deux groupes. A 6 mois de post-ischémie, le pourcentage d'inactivité est de $56,07 \pm 2,31$ % chez les rats sham tandis que ce pourcentage est de $34,07 \pm 3,01$ % à 1 mois après l'opération (\$\$\$ $p < 0,000$). Cet effet pourrait s'expliquer par la prise de poids des animaux observée dans les deux groupes (figure 55).

	1 mois		2 mois		4 mois		6 mois	
	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R
Nombre de rats exclus	n=0	n=1	n=0	n=0	n=2	n=1	n=1	n=0
Temps d'inactivité (en %)	$34,07 \pm 3,01$	$40,32 \pm 3,82$	$30,56 \pm 2,67$	$27,54 \pm 2,01^{\#}$	$46,21 \pm 4,11^{\$}$	$42,14 \pm 3,86$	$56,07 \pm 2,31^{$$$}$	$48,68 \pm 2,66$
	n=19	n=13	n=17	n=15	n=9	n=13	n=16	n=15
Vitesse moyenne (cm.s ⁻¹)	$6,80 \pm 0,35$	$5,47 \pm 0,41^*$	$5,92 \pm 0,31$	$5,81 \pm 0,42$	$4,69 \pm 0,35$	$5,07 \pm 0,41$	$3,82 \pm 0,24$	$4,85 \pm 0,40^*$
	n=19	n=13	n=17	n=15	n=9	n=13	n=16	n=15

Tableau 7 : Temps d'inactivité et vitesse maximum des groupes de rats lors du test de l'actimétrie. # $p < 0,05$ vs groupe I/R 1 mois, \$ $p < 0,05$ vs groupe sham 1 mois, \$\$\$ $p < 0,000$ vs groupe sham 1 mois, * $p < 0,05$ vs groupe sham.

La mesure de la vitesse moyenne met en évidence une réduction à 1 mois de post-ischémie (* $p < 0,05$) avec une vitesse moyenne de $5,47 \pm 0,41$ cm.s⁻¹ chez les rats ischémiés alors que la vitesse moyenne des rats sham s'élève à $6,80 \pm 0,35$ cm.s⁻¹. L'observation inverse est faite à 6 mois de post-ischémie puisque les rats sham ont une vitesse moyenne inférieure ($3,82 \pm 0,24$ cm.s⁻¹) en comparaison aux rats ischémiés ($4,85 \pm 0,40$ cm.s⁻¹) (* $p < 0,05$). Ces résultats sont à corrélérer avec la distance totale parcourue puisque la même cinétique d'évolution est observée.

Ces résultats permettent d'exclure une différence de locomotion spontanée entre les deux groupes de rats quelque soit le temps de post-ischémie ce qui permet de conclure sur les déficits observés par la suite indépendamment d'un problème locomoteur.

III.1.2. Utilisation asymétrique des pattes avant

Dans notre modèle, aucune différence n'est observée entre les rats sham et ischémiés-reperfusés quant à l'utilisation préférentielle de la patte ipsilatérale dans le test du cylindre quelque soit le temps d'étude de post-ischémie (figure 75).

	1 mois		2 mois		4 mois		6 mois	
	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R
Nombre de rats exclus	n=0	n=4	n=3	n=3	n=5	n=5	n=8	n=5

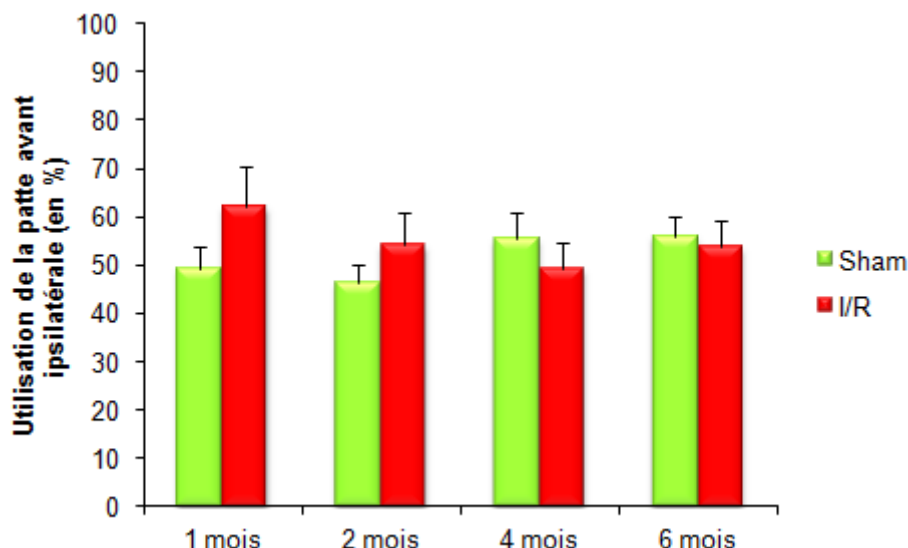


Figure 75 : Pourcentage d'utilisation de la patte avant ipsilatérale dans les deux groupes de rats au cours du temps. Sham 1m n=18 ; I/R 1m n=10 ; Sham 2m n=15 ; I/R 2m n=11 ; Sham 4m n=7 ; I/R 4m n=9 ; Sham 6m n=10 ; I/R 6m n=10.

III.1.3. Dextérité fine

Le test de l'escalier se révèle très pertinent pour observer les déficits au niveau de la dextérité fine des pattes avant.

Les résultats à 6 mois de post-ischémie ne sont pas exploitables car malgré l'appétence des rats, l'appareil est trop étroit en rapport à leur poids pour que la tâche à effectuer soit source de motivation.

	1 mois		2 mois		4 mois		6 mois	
	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R
Nombre de rats exclus	n=1	n=8	n=3	n=9	n=2	n=7	n=11	n=14
Jour 1	14,65 ± 2,27	6,75 ± 2,68*	13,25 ± 1,60	10,50 ± 3,54	13,70 ± 2,65	8,29 ± 3,37		
Jour 2	26,47 ± 1,93	10,25 ± 3,99***	23,94 ± 2,35	10,50 ± 2,68**	19,30 ± 3,31	12,43 ± 3,94		
Jour 3	28,82 ± 1,65	17,5 ± 3,70**	26,88 ± 2,00	16,17 ± 3,89*	19,70 ± 3,02	13,43 ± 3,43		
Jour 4	30,76 ± 1,65	19,25 ± 3,00**	29,38 ± 1,94	20,50 ± 3,96*	27,20 ± 1,95	17,29 ± 3,26*		
Jour 5	29,29 ± 2,19	21,13 ± 2,98*	32,25 ± 1,66	21,33 ± 3,99*	28,60 ± 2,23	18,00 ± 2,46*		

Tableau 8 : Nombre de granulés attrapés par les deux pattes et mangés lors de l'apprentissage du test de l'escalier. Sham 1m n=17 ; I/R 1m n=8 ; Sham 2m n=16 ; I/R 2m n=6 ; Sham 4m n=10 ; I/R 4m n=7. * p<0,05 vs groupe sham, ** p<0,005 vs groupe sham, *** p<0,000 vs groupe sham

Le test se déroule en deux phases. Durant les cinq premiers jours, les rats apprennent à manger les granulés. L'apprentissage met en évidence une augmentation du nombre de granulés mangés au cours de la semaine (tableau 8) au sein de chaque groupe. Le premier jour, les rats à 1 mois de post-ischémie mangent 14,65 ± 2,27 granulés et 6,75 ± 2,68 granulés respectivement pour les groupes sham et ischémié. Le cinquième jour, ces mêmes groupes mangent respectivement 29,29 ± 2,19 granulés (non noté p<0,000) et

21,13 ± 2,98 granulés (non noté p<0,005). Les groupes de rats sham mangent statistiquement plus de granulés en comparaison à leur groupe ischémié quelque soit le temps après l'opération (* p<0,05). En revanche, il n'y a pas de différence sur le nombre de granulés attrapés et mangés entre les différents temps de post-ischémies des groupes sham ou ischémiés.

Dans notre étude, les rats sham saisissent les granulés indifféremment avec l'une ou l'autre patte.

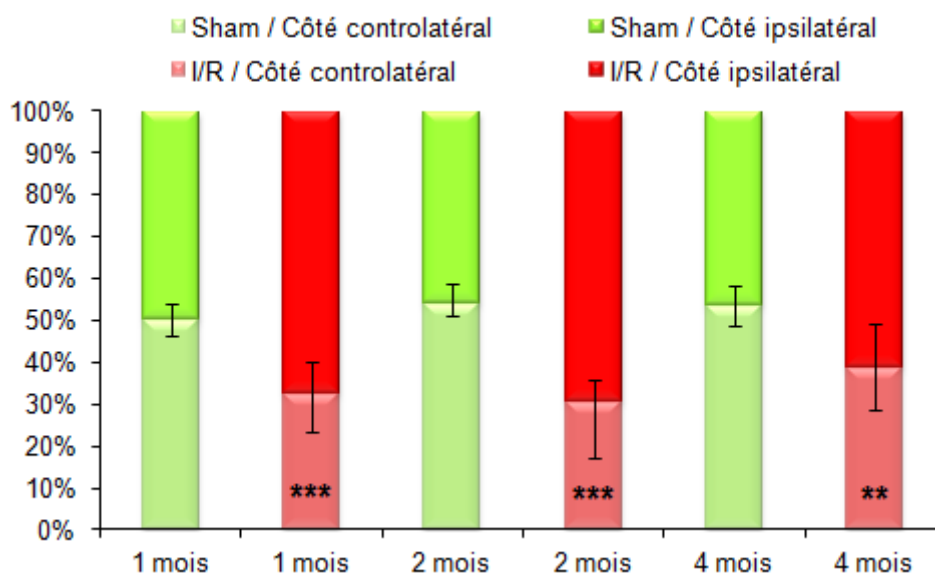


Figure 76 : Pourcentage d'utilisation des pattes avant controlatérale et ipsilatérale dans la saisie des granulés de chocolat dans le test de l'escalier. Sham 1m n=17 ; I/R 1m n=8 ; Sham 2m n=16 ; I/R 2m n=6 ; Sham 4m n=10 ; I/R 4m n=7. ** p<0,005 vs groupe sham, * p<0,000 vs groupe sham**

Les résultats mettent en évidence une utilisation de la patte controlatérale de 50,00 ± 3,83 %, 53,91 ± 2,88 % et 53,41 ± 4,50 % respectivement à 1, 2 et 4 mois de post-ischémie chez les rats sham. Chez les rats ischémiés, dès 1 mois de post-ischémie, la phase de test démontre un pourcentage significativement réduit de l'utilisation de la patte controlatérale pour saisir les granulés (figure 76). Les rats utilisent à 32,69 ± 9,24 % leur patte controlatérale à 1 mois de post-ischémie (***) p<0,000), 30,34 ± 13,20 % à 2 mois et 38,76 ± 10,01 % à 4 mois reflétant un déficit de la patte controlatérale pour saisir les granulés de chocolat.

III.1.4. Test de la nage forcée

Dans une future perspective thérapeutique, l'effet de l'ischémie-reperfusion a été testé sur le test de la nage forcée afin de pouvoir comparer par la suite avec des animaux traités pharmacologiquement. Les résultats préliminaires ne montrent aucun effet de l'ischémie sur le temps de nage des rats quelque soit le temps de post-ischémie (figure 77).

	1 mois		2 mois		4 mois		6 mois	
	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R
Nombre de rats exclus	n=1	n=1	n=1	n=1	n=0	n=1	n=0	n=1

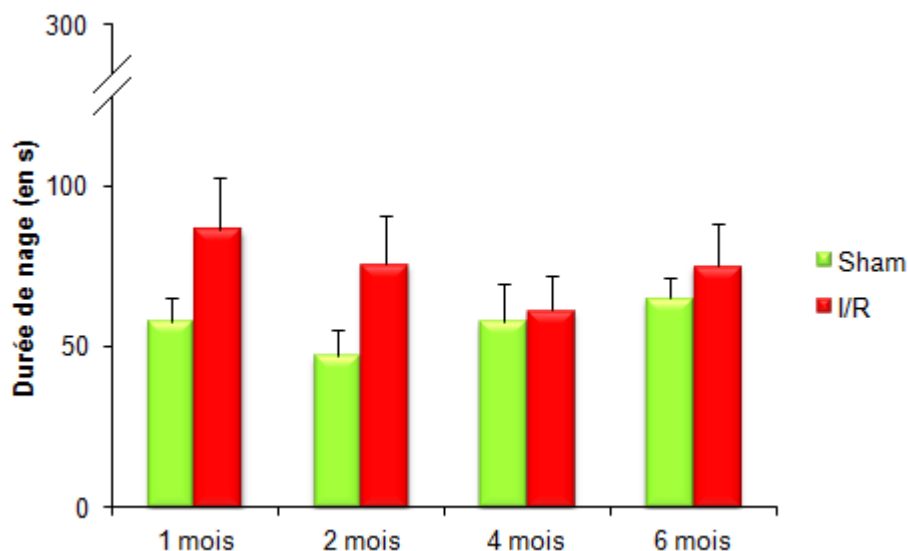


Figure 77 : Temps de nage lors du test de la nage forcée chez les deux groupes de rats au cours du temps. Sham 1m n=18 ; I/R 1m n=13 ; Sham 2m n=16 ; I/R 2m n=14 ; Sham 4m n=10 ; I/R 4m n=13 ; Sham 6m n=17 ; I/R 6m n=14.

III.2. Analyse de l'ADC par IRM

Dans la région du cortex qui contrôle les actions de la patte avant, le ratio du coefficient d'ADC est diminué à 24 heures en raison de l'œdème ($0,91 \pm 0,03$ dans le groupe I/R et $1,04 \pm 0,01$ dans le groupe sham) (figure 78).

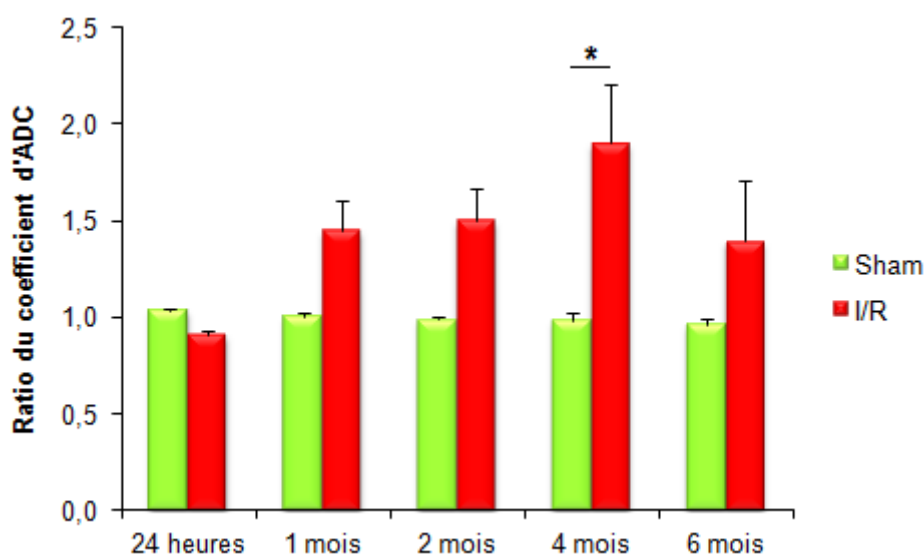


Figure 78 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région du cortex de la patte avant dans les deux groupes au cours du temps. Sham 24h n=19 ; I/R 24h n=32 ; Sham 1m n=5 ; I/R 1m n=32 ; Sham 2m n=5 ; I/R 2m n=25 ; Sham 4m n=5 ; I/R 4m n=18 ; Sham 6m n=3 ; I/R 6m n=8. * $p < 0,05$ vs groupe sham

De 1 à 4 mois de post-ischémie, le ratio d'ADC augmente de façon progressive ($1,45 \pm 0,15$; non noté $p < 0,005$ à 1 mois et $1,90 \pm 0,31$; non noté $p < 0,000$ à 4 mois) chez les rats ischémiés. A 4 mois de post-ischémie, la différence de ratio entre le groupe sham et le groupe ischémié est significative (* $p < 0,05$). Ce résultat reflète un degré de liberté de mouvements des molécules d'eau augmenté du côté ipsilatéral et par conséquent un tissu plus lâche dans cette zone.

En corrélant avec les séquences anatomiques T2, cette région se trouve souvent située dans le cœur de l'ischémie, zone où apparaissent les cavités porencéphaliques.

Chez les rats sham, le ratio reste proche de 1 et aucune variation n'est observée quelque soit le temps d'étude après l'opération.

III.3. Corrélations entre le ratio d'ADC et le déficit de la patte avant controlatérale

Afin d'étudier les possibles liens entre les lésions observées et le déficit moteur, plusieurs corrélations ont été effectuées (figure 79).

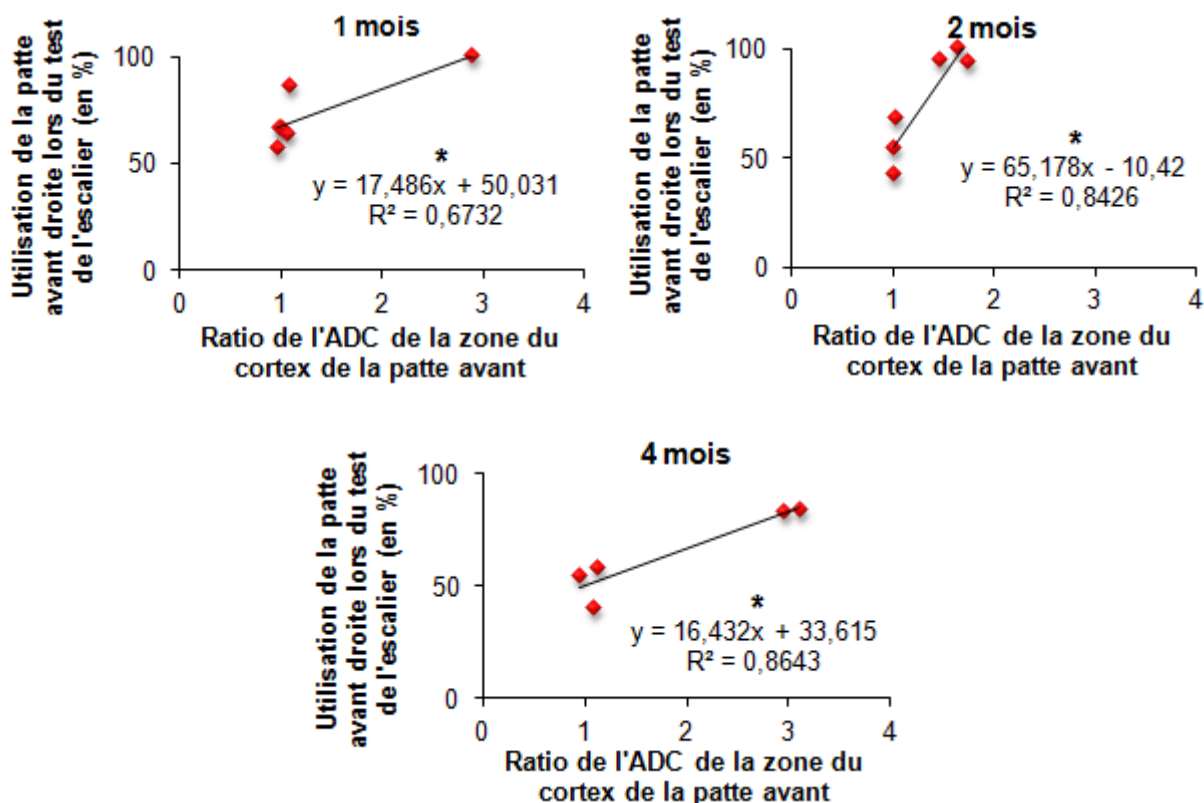


Figure 79 : Corrélations positive entre le ratio de l'ADC de la zone du cortex de la patte avant et le pourcentage d'utilisation de la patte droite lors du test de l'escalier à différents temps de post-ischémie (1, 2 et 4 mois) * $p < 0,05$

Les résultats mettent en évidence une corrélation positive entre le ratio dans la zone du cortex qui contrôle la patte avant et le pourcentage d'utilisation de cette patte avant droite dans le test de l'escalier (* p<0,05). Plus le ratio dans cette zone est augmenté, plus le rat va utiliser sa patte droite pour saisir les granulés de chocolat. En parallèle, il existe une corrélation positive entre le volume de la lésion totale et le pourcentage d'utilisation de la patte avant droite observée durant l'entièreté de l'étude (p<0,05). Ces observations sous-entendent qu'un tissu plus lâche dans la zone qui commande cette patte avant empêche l'utilisation fonctionnelle de celle-ci.

III.4. Etude de la densité cellulaire par coloration histologique

Les coupes de cerveaux ont permis d'effectuer un comptage cellulaire sur lames afin de connaître la densité cellulaire au sein des zones étudiées plus particulièrement en séquence de diffusion.

Le tableau 9 regroupe les résultats dans une zone impliquée dans la motricité (la zone du cortex contrôlant la patte avant). Le comptage cellulaire ne permet pas de mettre en évidence de différence quant à la densité cellulaire dans cette zone.

	1 mois				2 mois			
	Sham		I/R		Sham		I/R	
	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral
Cortex de la patte avant	870 ± 59	892 ± 58	581 ± 114	466 ± 96	777 ± 28	790 ± 6	906 ± 252	928 ± 235
	n=3	n=3	n=4	n=4	n=2	n=2	n=4	n=3
	4 mois				6 mois			
	Sham		I/R		Sham		I/R	
	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral
Cortex de la patte avant	744 ± 69	753 ± 64	733 ± 88	851 ± 85	702 ± 188	653 ± 90	602 ± 40	901 ± 128
	n=4	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=4	n=3

Tableau 9 : Résultats de la densité cellulaire (exprimée en nombre de cellules) dans la zone du cortex contrôlant la patte avant.

IV. Conséquences cognitives de l'ischémie-reperfusion

IV.1. Etude comportementale

IV.1.1. Mémoire à long terme

Ce type de mémoire est étudié via le test de l'évitement passif avec un temps de rétention de 24 heures.

La mesure du temps d'acquisition (correspondant au temps que met l'animal à rentrer dans le compartiment sombre) ne révèle aucune différence entre les groupes (tableau 10).

	1 mois		2 mois		4 mois		6 mois	
	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R
Nombre de rats exclus	n=0	n=1	n=0	n=1	n=0	n=0	n=1	n=2
Temps d'acquisition (en s)	19,75 ± 3,11	18,92 ± 5,57	28,27 ± 9,63	15,93 ± 6,47	21,71 ± 4,62	26,74 ± 5,16	17,47 ± 3,83	26,33 ± 7,16
	n=10	n=11	n=6	n=4	n=7	n=12	n=15	n=11

Tableau 10 : temps d'acquisition lors de la première journée du test de l'évitement passif.

Lors de la phase de test, le temps de latence pour retourner dans le compartiment sombre est diminué de façon significative à 1 mois de post-ischémie chez les rats ischémiés ($307,32 \pm 79,26$ s ; *** $p < 0,000$) en comparaison aux rats sham ($600,00 \pm 0,00$ s).

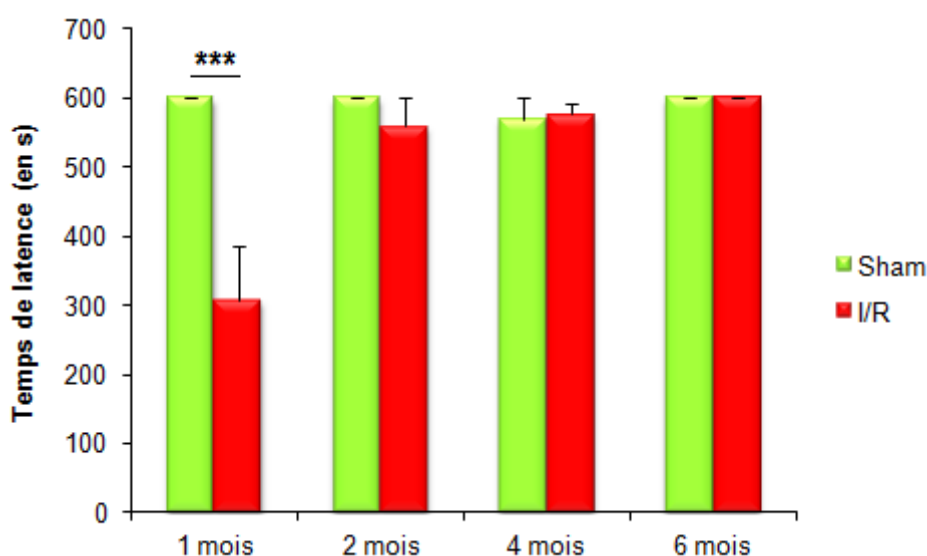


Figure 80 : Temps de latence pour retourner dans le compartiment sombre lors du test de l'évitement passif dans les deux groupes de rats au cours du temps. Sham 1m n=10 ; I/R 1m n=11 ; Sham 2m n=6 ; I/R 2m n=3 ; Sham 4m n=7 ; I/R 4m n=12 ; Sham 6m n=15 ; I/R 6m n=6. *** $p < 0,000$ vs groupe sham

Cette différence n'est pas retrouvée lors des temps d'étude suivants (figure 80) où le temps de latence est proche de 600 s reflétant un déficit transitoire de la mémoire à long terme à 1 mois de post-ischémie.

IV.1.2. Mémoire de travail

Le test de l'alternance spontanée ne démontre pas de différence significative lors des premiers mois de l'étude malgré une tendance à la baisse chez les rats ischémiés-reperfusés où le pourcentage d'alternances diminue progressivement et significativement au cours de l'étude (non noté $p < 0,05$) (figure 81). Il est diminué significativement à 6 mois de post-ischémie chez le groupe ischémié par rapport au groupe sham ($67,33 \pm 2,94$ % vs $77,57 \pm 1,66$ % ; * $p < 0,05$). Ces résultats mettent en évidence un déficit de la mémoire de travail chez les rats à 6 mois de post-ischémie.

	1 mois		2 mois		4 mois		6 mois	
	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R	Sham	I/R
Nombre de rats exclus	n=0	n=5	n=1	n=2	n=4	n=4	n=9	n=9

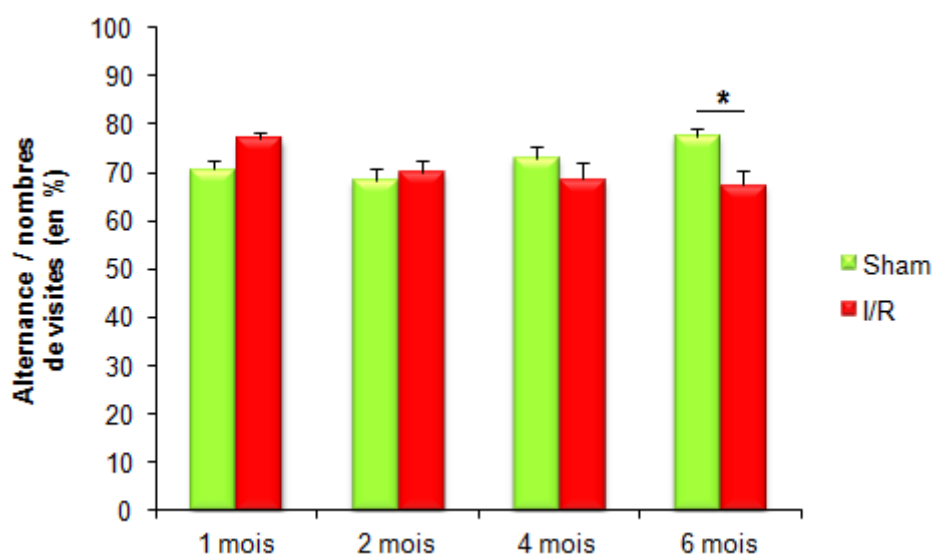


Figure 81 : Pourcentage d'alternances lors du test de l'alternance spontanée dans les deux groupes de rats au cours du temps. Sham 1m n=18 ; I/R 1m n=9 ; Sham 2m n=17 ; I/R 2m n=13 ; Sham 4m n=8 ; I/R 4m n=10 ; Sham 6m n=7 ; I/R 6m n=6. * p<0,05 vs groupe sham

IV.1.3. Mémoire spatiale

Le test de la piscine de Morris est employé dans notre étude pour tester la mémoire spatiale hippocampe-dépendante. Il a été employé uniquement chez les rats à 6 mois de post-ischémie et 2 rats ont été exclus du groupe ischémié.

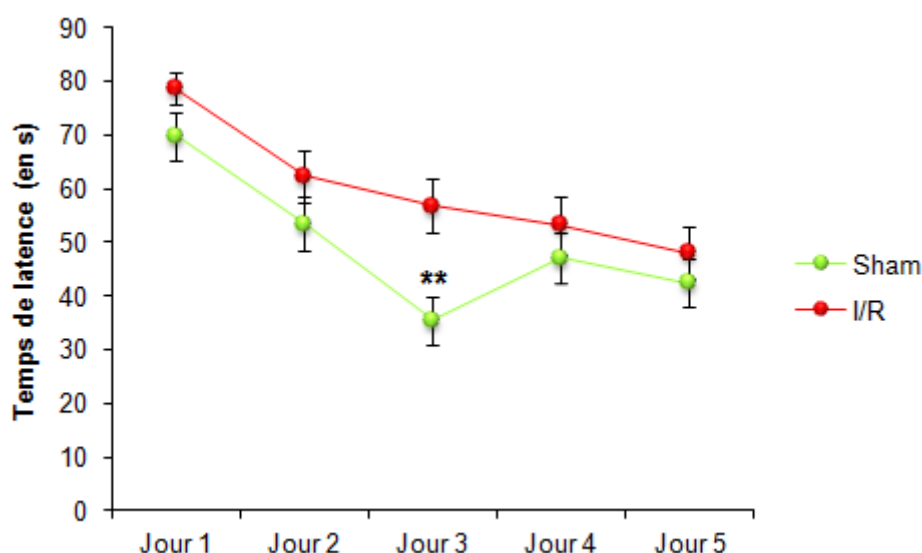


Figure 82 : Courbes d'apprentissage concernant le temps de latence pour atteindre la plate-forme lors du test de la piscine de Morris pour les deux groupes de rats à 6 mois de post-ischémie. Sham n=40 ; I/R n=40. ** p<0,005 vs groupe sham

Les courbes mettent en évidence un apprentissage des deux groupes de rats pour retrouver la plate-forme (figure 82). Les rats sham passent d'un temps de latence de $69,8 \pm 4,52$ s le premier jour à $42,45 \pm 4,37$ s le cinquième jour (non noté $p < 0,000$). Les rats ischémisés commencent leur apprentissage à $78,68 \pm 2,97$ s le premier jour et terminent leur apprentissage à $48,03 \pm 4,89$ s (non noté $p < 0,000$). Toutefois, au sein du groupe sham, cet apprentissage est plus rapide puisque le temps de latence lors du troisième jour est statistiquement inférieur dans ce groupe ($35,43 \pm 4,59$ s vs $56,7 \pm 5,04$ s ; ** $p < 0,005$).

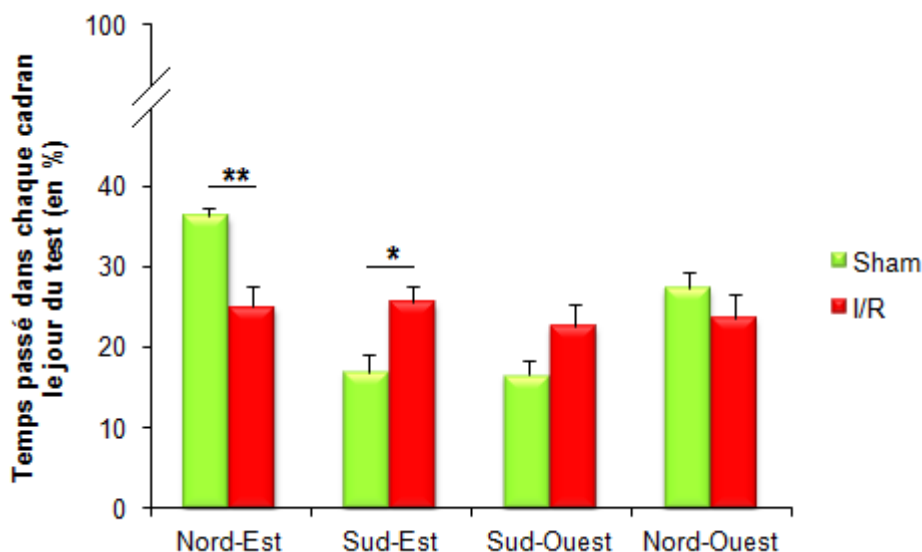


Figure 83 : Pourcentage du temps passé lors du test dans chaque quadrant de la piscine de Morris. Le quadrant Nord-Est est le quadrant cible où se trouvait la plate-forme durant la phase d'apprentissage. Sham n=8 ; I/R n=9. * $p < 0,05$ vs groupe sham, ** $p < 0,005$ vs groupe sham.

La phase de test révèle que les rats ischémisés passent indifféremment du temps dans chaque quadrant à hauteur de 25 % environ (figure 83). A l'opposé, les rats sham passent plus de temps dans le quadrant cible Nord-Est, où se trouvait la plate-forme durant l'apprentissage avec $36,31 \pm 1,04$ % du temps dans cette zone alors que les rats ischémisés passent $25,00 \pm 2,67$ % (** $p < 0,005$). Le quadrant jouxtant celui-ci est statistiquement beaucoup moins visité par les rats sham ($16,93 \pm 2,14$ %) en comparaison aux rats ischémisés ($25,61 \pm 2,09$ % ; * $p < 0,05$).

D'autres paramètres sont étudiés lors de cette phase de test. Le temps de latence pour atteindre la plate-forme la première fois ne démontre pas de différence entre les deux groupes malgré une tendance à un temps augmenté chez les rats ischémisés ($71,34 \pm 10,57$ s chez les rats ischémisés et $45,51 \pm 12,12$ s chez les rats sham) (figure 84A). Le nombre de croisements de la zone de la plate-forme le jour du test met en évidence une différence entre les groupes, les rats sham croisent celle-ci beaucoup plus souvent ($1,88 \pm 0,48$) que les rats ischémisés ($0,33 \pm 0,17$; * $p < 0,05$) (figure 84B).

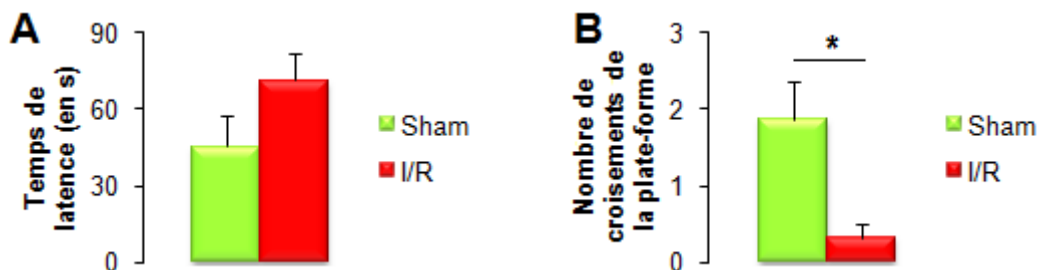


Figure 84 : Temps de latence pour atteindre la plate-forme (A), et nombre de croisements de la zone de la plate-forme (B) le jour du test par les deux groupes de rats. Sham n=8 ; I/R n=9. * p<0,05 vs groupe sham

Au travers des différents paramètres, les rats sham se souviennent de la localisation de la plate-forme et sont capables de restituer la tâche lors de la phase de test alors que les rats ischémiés montrent un déficit à la fois dans la vitesse d'apprentissage et la restitution de la tâche confirmant un déficit de mémoire spatiale.

IV.2. Analyse IRM

IV.2.1. Evolution des structures anatomiques

Les structures anatomiques impliquées dans les processus mnésiques sont étudiées à travers l'IRM.

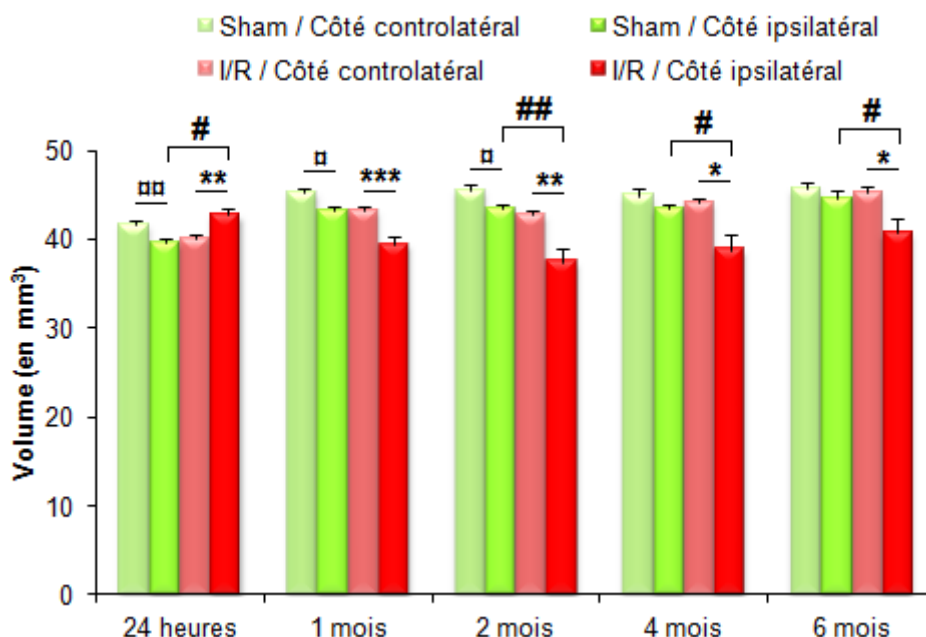


Figure 85 : Evolution du volume des hippocampes des deux groupes de rats au cours du temps. Sham 24h n=55 ; I/R 24h n=69 ; Sham 1m n=12 ; I/R 1m n=53 ; Sham 2m n=16 ; I/R 2m n=41 ; Sham 4m n=11 ; I/R 4m n=28 ; Sham 6m n=19 ; I/R 6m n=24. * p<0,05 vs groupe I/R controlateral, ** p<0,005 vs groupe I/R controlateral, *** p<0,000 vs groupe I/R controlateral, # p<0,05 vs groupe sham ipsilateral, ## p<0,005 vs groupe sham ipsilateral, □ p<0,05 vs groupe sham controlateral, □□ p<0,005 vs groupe sham controlateral.

L'étude par imagerie du volume de chaque hippocampe contro- et ipsilatéral révèle plusieurs résultats (figure 85). L'hippocampe controlateral des deux groupes de rats croît de

manière similaire et significative (non noté $p < 0,000$) entre 24 heures de reperfusion et 1 mois de post-ischémie puis le volume se stabilise.

L'hippocampe ipsilatéral des rats sham ne montre pas d'évolution au cours des mois. Dans le groupe I/R, le volume de l'hippocampe ipsilatéral est supérieur à 24 heures de reperfusion ($42,75 \pm 0,67 \text{ mm}^3$) suite à la présence de l'œdème par rapport au côté controlatéral ($40,18 \pm 0,35 \text{ mm}^3$; ** $p < 0,005$). Dès 1 mois de post-ischémie, cet hippocampe a un volume significativement réduit (***) en comparaison au côté controlatéral, le volume étant de $39,52 \pm 0,80 \text{ mm}^3$ du côté ipsilatéral versus $43,31 \pm 0,40 \text{ mm}^3$ du côté controlatéral. Cette différence est observée jusqu'à la fin de l'étude (* $p < 0,05$).

La comparaison entre les deux groupes permet d'observer une différence significative quant au volume de l'hippocampe ipsilatéral des animaux ischémiés en comparaison aux rats sham à 24 heures de reperfusion et de 2 à 6 mois de post-ischémie (# $p < 0,05$). A 1 mois de post-ischémie, la tendance observée n'est pas statistique ($p = 0,069$).

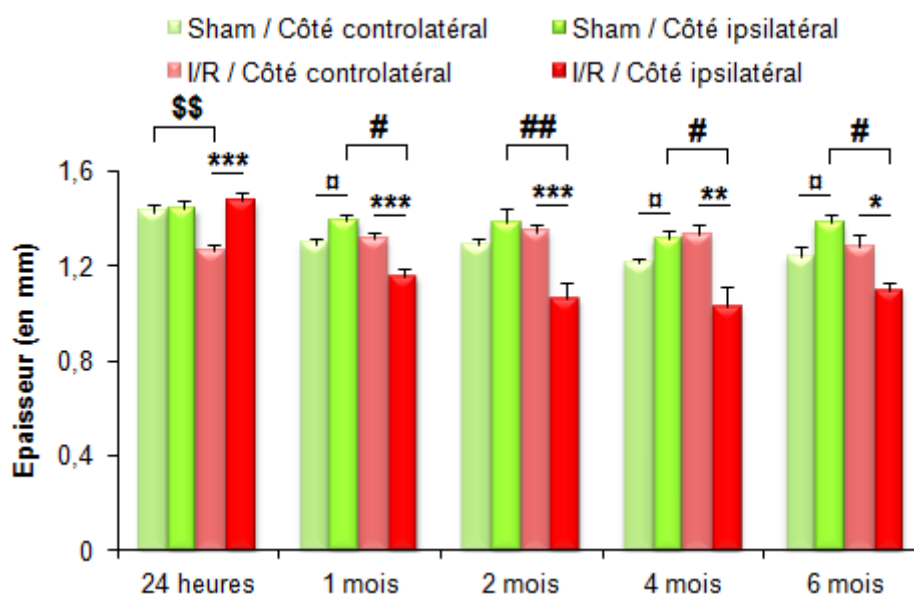


Figure 86 : Evolution de l'épaisseur du cortex entorhinal des deux groupes de rats au cours du temps. Sham 24h n=20 ; I/R 24h n=37 ; Sham 1m n=5 ; I/R 1m n=36 ; Sham 2m n=5 ; I/R 2m n=26 ; Sham 4m n=5 ; I/R 4m n=17 ; Sham 6m n=5 ; I/R 6m n=7. * $p < 0,05$ vs groupe I/R controlatéral, ** $p < 0,005$ vs groupe I/R controlatéral, * $p < 0,000$ vs groupe I/R controlatéral, # $p < 0,05$ vs groupe sham controlatéral, ## $p < 0,005$ vs groupe sham ipsilatéral, # $p < 0,05$ vs groupe sham ipsilatéral, # $p < 0,05$ vs groupe sham controlatéral, # $p < 0,05$ vs groupe sham controlatéral, \$\$\$ $p < 0,005$ vs groupe sham controlatéral.**

L'étude de l'épaisseur du cortex entorhinal montre la même tendance à l'atrophie observée au niveau de l'hippocampe (figure 86). Au sein du groupe ischémié, l'épaisseur du cortex entorhinal controlatéral ne varie pas au cours du temps. A 24 heures de reperfusion, la différence est significative en comparaison au groupe sham ($1,27 \pm 0,02 \text{ mm}$ vs $1,43 \pm 0,03 \text{ mm}$; \$\$ $p < 0,005$).

L'épaisseur du cortex entorhinal du côté ipsilatéral à la lésion est statistiquement différente tout au long de l'étude en comparaison au côté controlatéral chez les rats ischémiés. A 24 heures de reperfusion, en raison de l'œdème, l'épaisseur est plus importante du côté ipsilatéral ($1,47 \pm 0,04$ mm vs $1,27 \pm 0,02$ mm ; *** $p < 0,000$). Dès 1 mois de post-ischémie, les résultats s'inversent et l'épaisseur du côté ipsilatéral est inférieure avec $1,16 \pm 0,03$ mm du côté ipsilatéral et $1,31 \pm 0,03$ mm du côté controlatéral (*** $p < 0,000$). Cette différence perdure durant toute l'étude.

En parallèle à ce résultat, et également de 1 à 6 mois de post-ischémie, il y a une différence statistique entre l'épaisseur du cortex entorhinal ipsilatéral chez les rats sham et chez les rats ischémiés (# $p < 0,05$).

IV.2.2. Analyse de l'ADC par IRM

L'étude du coefficient de diffusion de l'eau est également effectuée au sein de régions impliquées dans les processus mnésiques.

Le corps calleux est une région impliquée dans les échanges inter-hémisphériques, l'étude du ratio de l'ADC à ce niveau ne démontre aucune différence chez les animaux sham quelque soit le temps (figure 87) ce qui implique que le tissu a la même densité des deux côtés du cerveau.

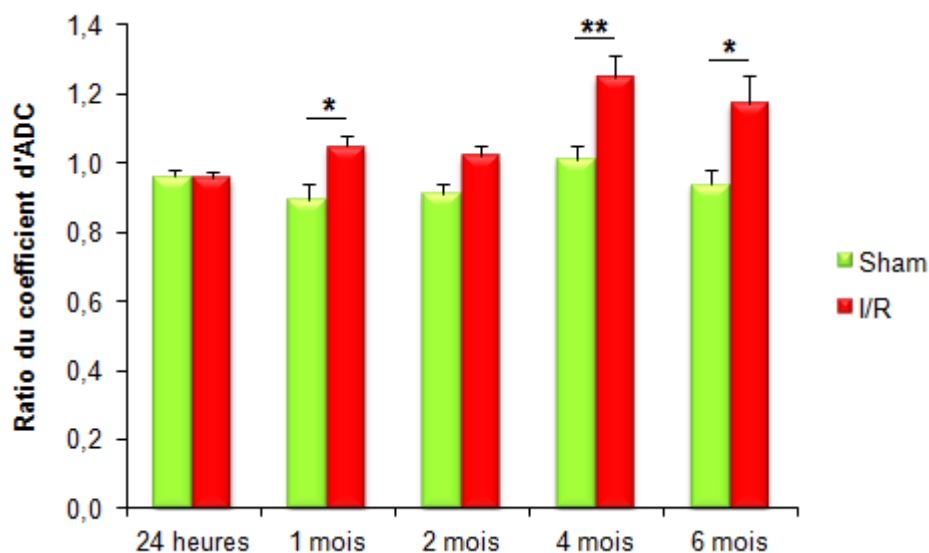


Figure 87 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région du corps calleux dans les deux groupes au cours du temps. Sham 24h n=1 ; I/R 24h n=32 ; Sham 1m n=5 ; I/R 1m n=32 ; Sham 2m n=5 ; I/R 2m n=25 ; Sham 4m n=5 ; I/R 4m n=18 ; Sham 6m n=3 ; I/R 6m n=8. * $p < 0,05$ vs groupe sham, ** $p < 0,005$ vs groupe sham

Chez les rats ischémiés, le coefficient ADC augmente au fur et à mesure du temps. A 1 mois de post-ischémie, il est augmenté de manière significative (* $p < 0,05$) avec une valeur de $1,05 \pm 0,03$ en comparaison à une valeur chez les rats sham de $0,89 \pm 0,04$. A 2

mois de post-ischémie, la tendance n'est pas significative. Par la suite, à 4 mois de post-ischémie, cette observation est significative (** $p < 0,005$) avec un ratio augmenté à $1,25 \pm 0,06$ pour les rats ischémiés et une valeur chez les rats sham de $1,01 \pm 0,04$. A 6 mois de post-ischémie, la tendance est la même avec une valeur de $1,17 \pm 0,08$ chez les rats ischémiés (* $p < 0,05$) et chez les animaux sham de $0,94 \pm 0,04$. De plus, les résultats montrent une augmentation significative du ratio en comparaison au groupe 24 heures au cours du temps hormis à 2 mois de post-ischémie (non noté $p < 0,05$).

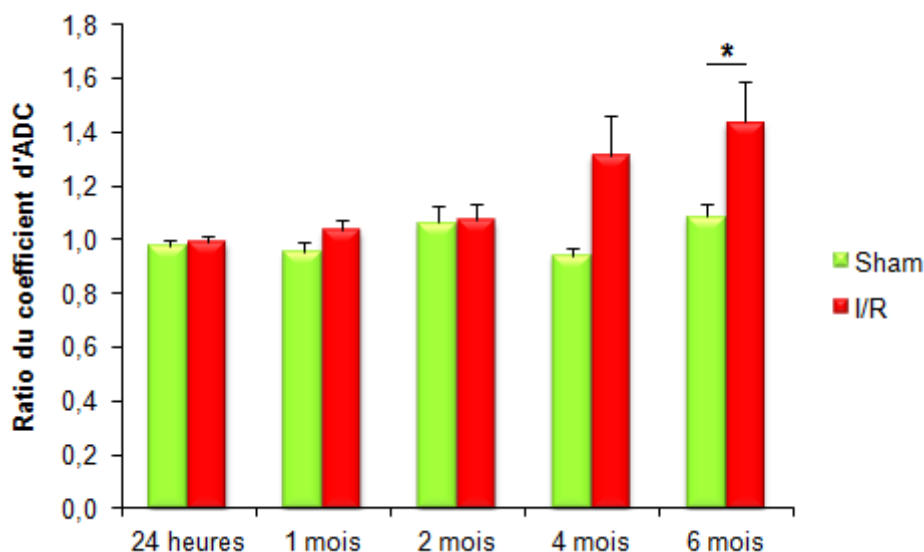


Figure 88 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région du cortex entorhinal dans les deux groupes au cours du temps. Sham 24h n=22 ; I/R 24h n=32 ; Sham 1m n=5 ; I/R 1m n=37 ; Sham 2m n=5 ; I/R 2m n=30 ; Sham 4m n=5 ; I/R 4m n=23 ; Sham 6m n=16 ; I/R 6m n=27. * $p < 0,05$ vs groupe sham

Le cortex entorhinal est également une zone impliquée dans les processus mnésiques et qui n'est pas touchée initialement par l'ischémie. Chez les groupes sham, aucune différence n'est observée au cours du temps (figure 88). Dans le groupe ischémié, le ratio ne varie pas durant les 2 premiers mois de l'étude. A 6 mois de post-ischémie, le ratio augmente de manière significative (* $p < 0,05$), avec des valeurs dans le groupe I/R à $1,44 \pm 0,15$ en comparaison au groupe sham ($1,09 \pm 0,05$). Ces valeurs sont statistiquement différentes au sein du groupe ischémié par rapport aux valeurs à 24 heures de reperfusion (non noté $p < 0,000$) reflétant une augmentation du ratio ADC au cours du temps.

L'étude du ratio de l'ADC dans la région CA3 de l'hippocampe, région la plus développée sur le plan de coupe étudié, révèle une différence significative (** $p < 0,005$) à 6 mois de post-ischémie également avec une valeur de $1,18 \pm 0,07$ au sein du groupe I/R tandis que ce ratio d'ADC est de $0,98 \pm 0,02$ chez les rats sham (figure 89). Aucune différence n'est détectée chez les rats sham. Par ailleurs, l'ADC augmente au cours du temps au sein du groupe ischémié, entre 24 heures et 6 mois de post-ischémie de manière

significative (non noté $p < 0,000$) avec des ratios de $1,00 \pm 0,02$ à 24 heures et $1,18 \pm 0,07$ à 6 mois de post-ischémie.

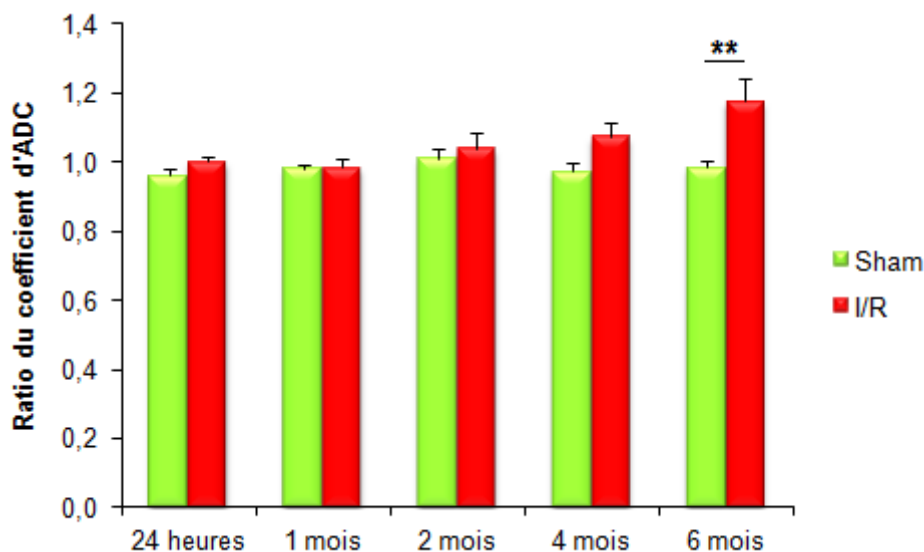


Figure 89 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région de l'hippocampe dans les deux groupes au cours du temps. Sham 24h n=22 ; I/R 24h n=33 ; Sham 1m n=5 ; I/R 1m n=37 ; Sham 2m n=5 ; I/R 2m n=30 ; Sham 4m n=5 ; I/R 4m n=23 ; Sham 6m n=15 ; I/R 6m n=27. ** $p < 0,005$ vs groupe sham.

L'amygdale est une zone impliquée dans les émotions et notamment lors du penchant aversif du test de l'évitement passif.

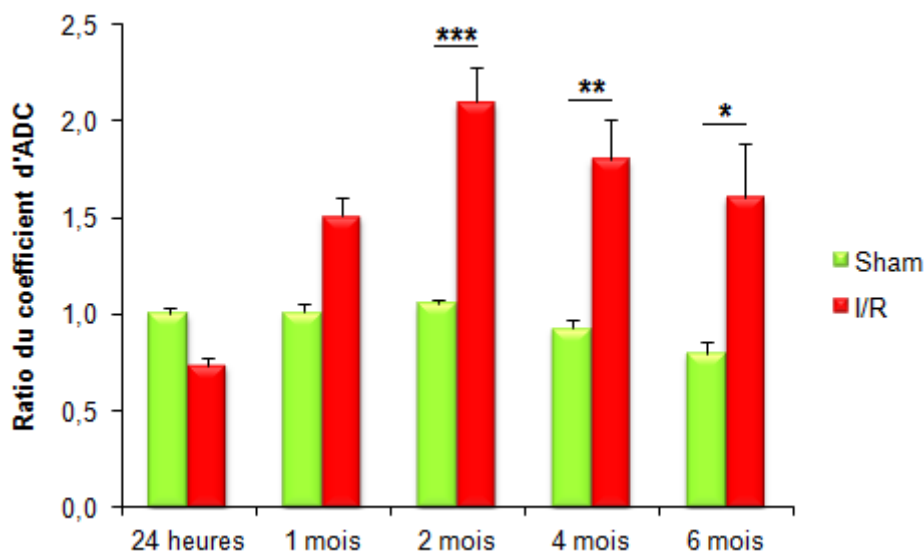


Figure 90 : Ratio du coefficient d'ADC au niveau de la région de l'amygdale dans les deux groupes au cours du temps. Sham 24h n=19 ; I/R 24h n=30 ; Sham 1m n=5 ; I/R 1m n=32 ; Sham 2m n=5 ; I/R 2m n=25 ; Sham 4m n=5 ; I/R 4m n=18 ; Sham 6m n=3 ; I/R 6m n=8. * $p < 0,05$ vs groupe sham, ** $p < 0,005$ vs groupe sham, *** $p < 0,000$ vs groupe sham.

Les rats sham ne présentent aucune différence au cours du temps (figure 90). A 24 heures de reperfusion, le ratio de l'ADC est de $0,74 \pm 0,03$, ce ratio n'est pas

significativement inférieur par rapport au sham ($1,01 \pm 0,03$) mais il est largement inférieur (non noté $p < 0,000$) aux ratios de l'ADC observés chez les rats ischémiés au cours du temps. Dès 2 mois de post-ischémie, la différence de ratio est significative entre le groupe sham et le groupe ischémié ($1,06 \pm 0,02$ vs $2,10 \pm 0,18$; *** $p < 0,000$) et cette différence perdure jusqu'à la fin de l'étude, à 6 mois les ratios étant de $0,80 \pm 0,06$ et de $1,61 \pm 0,27$ (* $p < 0,05$), respectivement pour le groupe sham et le groupe ischémié.

Cependant, cette zone est particulièrement touchée par l'ischémie et se nécrose fréquemment pour se trouver au sein d'une cavité porencéphalique.

IV.3. Corrélation entre l'ADC et le déficit mnésique

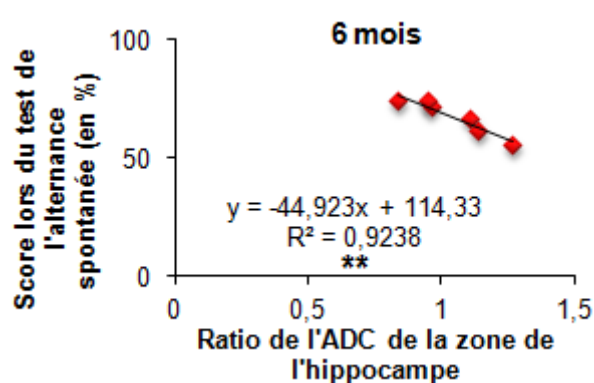


Figure 91 : Corrélation négative entre le score lors du test de l'alternance spontanée et le ratio de l'ADC de la zone de l'hippocampe à 6 mois de post-ischémie ** $p < 0,005$

Il existe une corrélation négative (** $p < 0,005$) entre le ratio de l'ADC de la zone de l'hippocampe et le score obtenu lors du test de l'alternance spontanée à 6 mois de post-ischémie (figure 91). Plus ce ratio est élevé, moins le score reflète une alternance du rat lors de ce test. Un tissu plus lâche dans cette zone témoignerait de phénomènes de désafférences qui empêcheraient le rat d'effectuer correctement la tâche et perturberait sa mémoire de travail.

IV.4. Etude histologique

IV.4.1. Densité cellulaire

Le comptage cellulaire a été effectué au sein de différentes zones impliquées dans la mémoire et déjà étudiées à travers la séquence de diffusion lors de l'IRM. La coloration à l'aide de crésyl violet permettant une plus grande précision, il est possible de reconnaître les structures qui composent l'hippocampe et d'être plus précis dans la décomposition du comptage cellulaire. Par conséquent, les zones étudiées ont été le corps calleux plus particulièrement dans le « genou », l'amygdale pour son implication dans le côté émotionnel lors des tests, le cortex entorhinal pour son implication dans la boucle tri-synaptique et

l'hippocampe avec plusieurs régions bien précises tels que la CA1, CA2, CA3, CA4 et le gyrus denté.

	1 mois				2 mois			
	Sham		I/R		Sham		I/R	
	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral
Gyrus Denté	452 ± 66	486 ± 43	446 ± 119	416 ± 138	613 ± 60	544 ± 36	366 ± 94	405 ± 128
	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3
CA1	121 ± 23	121 ± 13	92 ± 8	61 ± 20	105 ± 10	109 ± 12	103 ± 10	128 ± 27
	n=3	n=3	n=3	n=2	n=3	n=3	n=3	n=3
CA2	125 ± 10	151 ± 35	123 ± 10	112 ± 14	133 ± 21	154 ± 19	115 ± 9	142 ± 35
	n=3	n=3	n=3	n=2	n=3	n=3	n=3	n=3
CA3	126 ± 23	142 ± 40	101 ± 13	96 ± 10	124 ± 16	134 ± 27	134 ± 65	133 ± 44
	n=3	n=3	n=3	n=2	n=3	n=3	n=3	n=3
CA4	121 ± 6	98 ± 7	89 ± 17	74 ± 10	108 ± 7	122 ± 19	87 ± 4	104 ± 9
	n=3	n=2	n=3	n=2	n=3	n=3	n=3	n=3
Cortex entorhinal	394 ± 17	384 ± 53	289 ± 14	276 ± 57	442	304 ± 81	526 ± 186	587 ± 162
	n=2	n=3	n=2	n=2	n=1	n=2	n=2	n=2
Corps calleux	363 ± 54	331 ± 68	331 ± 59	354 ± 87	284 ± 48	294 ± 8	367 ± 22	365 ± 11
	n=3	n=3	n=3	n=3	n=2	n=2	n=2	n=2
Amygdale	483 ± 87	452 ± 55	584 ± 322	432 ± 63	522	512 ± 111	429	691
	n=2	n=3	n=3	n=3	n=1	n=3	n=1	n=1
	4 mois				6 mois			
	Sham		I/R		Sham		I/R	
	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral	Controlatéral	Ipsilatéral
Gyrus Denté	508 ± 34	518 ± 42	417 ± 25	476 ± 66	370 ± 173	504 ± 171	443 ± 125	451 ± 124
	n=3	n=4	n=3	n=3	n=2	n=3	n=3	n=3
CA1	122 ± 15	126 ± 11	85 ± 14	106 ± 14	112 ± 7	114 ± 24	106 ± 16	93 ± 4
	n=3	n=4	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3
CA2	143 ± 16	130 ± 10	89 ± 21	129 ± 40	126 ± 20	116 ± 12	101 ± 17	105 ± 15
	n=3	n=4	n=2	n=2	n=3	n=3	n=3	n=3
CA3	145 ± 23	154 ± 19	81 ± 15	115 ± 36	154 ± 36	107 ± 22	64 ± 7	71 ± 3
	n=3	n=4	n=2	n=2	n=3	n=3	n=3	n=3
CA4	107 ± 7	117 ± 7	96 ± 21	91 ± 15	110 ± 22	105 ± 20	78 ± 3	73 ± 5
	n=3	n=4	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3
Cortex entorhinal	304 ± 1	315 ± 47	270 ± 39	300 ± 48	212 ± 8	254 ± 81	245 ± 10	292 ± 28
	n=2	n=2	n=3	n=2	n=2	n=2	n=2	n=2
Corps calleux	304 ± 85	359 ± 45	412	610 ± 63	365 ± 61	260 ± 51	299 ± 30	304 ± 12
	n=3	n=3	n=1	n=2	n=2	n=3	n=3	n=2
Amygdale	456 ± 77	368 ± 34	443	ND	355 ± 91	374 ± 104	373	ND
	n=2	n=2	n=1	ND	n=3	n=3	n=1	ND

Tableau 11 : Résultats de la densité cellulaire (exprimée en nombre de cellules) dans différentes zones impliquées dans les processus mnésiques (corps calleux, amygdale, cortex entorhinal, hippocampe).

Le tableau ci-dessus (tableau 11) regroupe l'ensemble des résultats qui ne permettent pas d'observer une différence entre les groupes ou au cours de l'étude.

IV.4.2. Surface cellulaire

La quantification de la surface cellulaire a été ciblée sur les différentes régions de l'hippocampe.

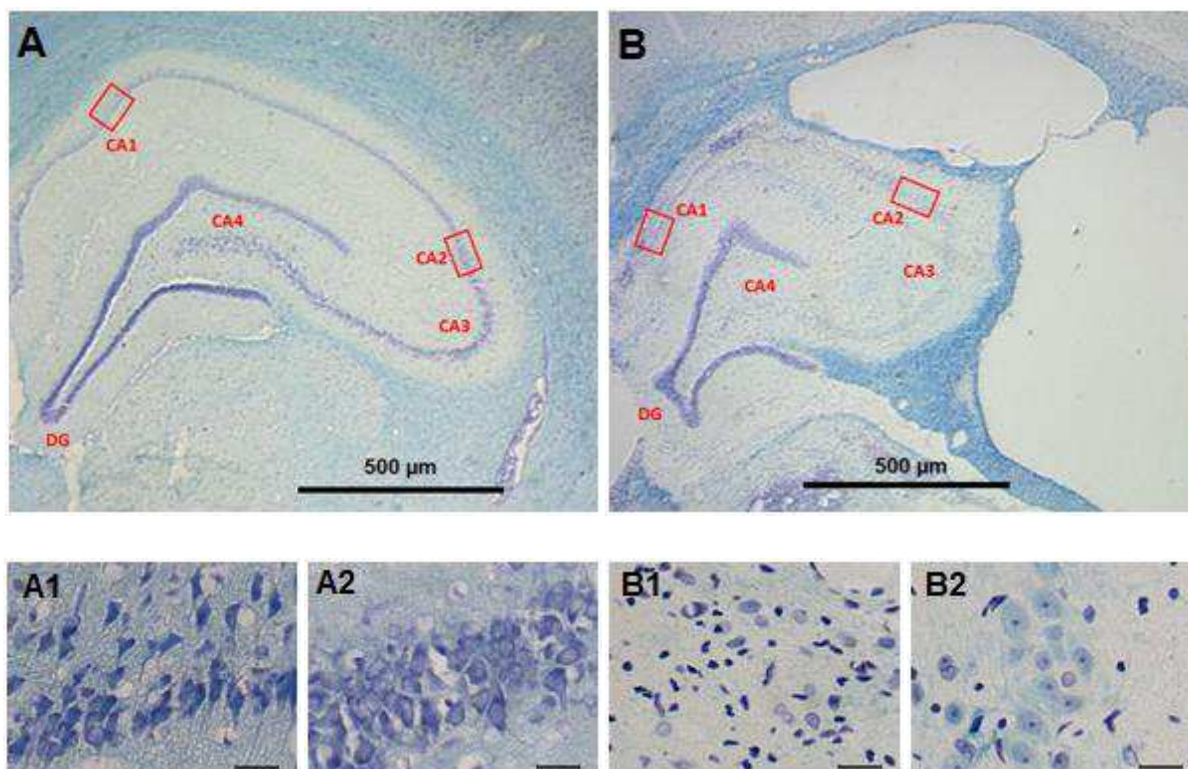


Figure 92 : Photos représentant une coupe au niveau de l'hippocampe ipsilatéral d'un rat sham (A) et d'un rat ischemié (B) à 2 mois de post-ischemie. Les carrés représentent les zones détaillées, la zone CA1 d'un rat sham (A1), la zone CA2 d'un rat sham (A2), la zone CA1 d'un rat ischemié (B1) et la zone CA2 d'un rat ischemié (B2). Echelle 20 µm sur les zones détaillées.

L'examen microscopique des coupes à des stades identiques met en évidence l'atrophie hippocampique chez les rats ischemiés (figure 92B) alors que celle-ci est absente chez les rats sham (figure 92A). Le détail des zones CA1 et CA2 montre des différences de morphologie apparaissant suite à l'ischemie (figure 92B1 & 92B2) comme des cellules plus petites avec un cytoplasme réduit et une morphologie moins caractéristique en comparaison aux rats sham. De même, l'hippocampe des rats ischemiés présente des cellules contenant des noyaux pycnotiques.

La surface cellulaire, quantifiée sur les coupes de cerveaux du côté ipsilatéral met en évidence des résultats différents selon les zones observées. Dans la zone CA1, la différence est identique au décours du temps (figure 93). Dès 1 mois de post-ischemie et jusqu'à la fin de l'étude, la surface cellulaire est inférieure dans le groupe ischemié par

rapport aux rats sham. A 1 mois, la surface d'une cellule est de $48,94 \pm 2,30 \mu\text{m}^2$ au sein du groupe sham tandis qu'elle n'est que de $31,81 \pm 2,46 \mu\text{m}^2$ dans le groupe ischémié (** $p < 0,000$). A 6 mois, la surface cellulaire est de $56,39 \pm 3,57 \mu\text{m}^2$ (** $p < 0,000$) chez les rats sham et de $38,67 \pm 1,80 \mu\text{m}^2$ au sein du groupe ischémié.

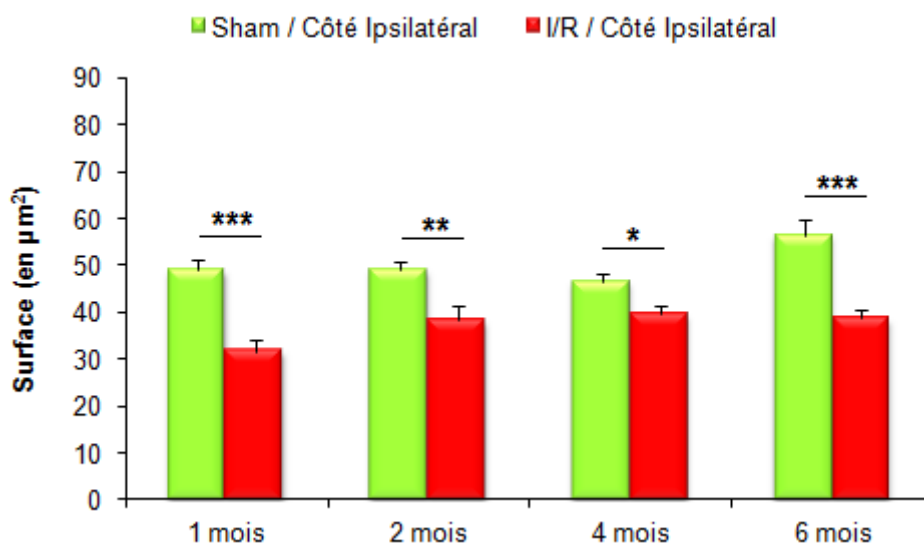


Figure 93 : Evolution de la surface cellulaire de la zone CA1 de l'hippocampe ipsilatéral des deux groupes de rats au cours du temps. Sham 1m n=60 ; I/R 1m n=40 ; Sham 2m n=60 ; I/R 2m n=60 ; Sham 4m n=60 ; I/R 4m n=60 ; Sham 6m n=60 ; I/R 6m n=60. * $p < 0,05$ vs groupe sham, ** $p < 0,005$ vs groupe sham, *** $p < 0,000$ vs groupe sham.

La cinétique d'évolution est identique dans la zone CA2 (figure 94).

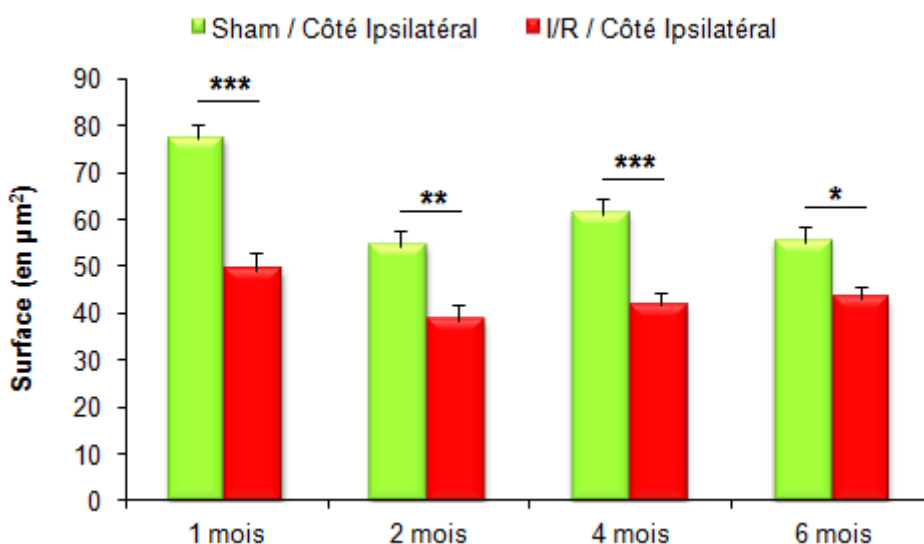


Figure 94 : Evolution de la surface cellulaire de la zone CA2 de l'hippocampe ipsilatéral des deux groupes de rats au cours du temps. Sham 1m n=60 ; I/R 1m n=40 ; Sham 2m n=60 ; I/R 2m n=60 ; Sham 4m n=80 ; I/R 4m n=40 ; Sham 6m n=60 ; I/R 6m n=60. * $p < 0,05$ vs groupe sham, ** $p < 0,005$ vs groupe sham, *** $p < 0,000$ vs groupe sham.

A 1 mois de post-ischémie, la surface cellulaire est de $77,36 \pm 2,79 \mu\text{m}^2$ dans le groupe sham et de $49,33 \pm 3,61 \mu\text{m}^2$ dans le groupe de rats ischémiés (** $p < 0,000$). A 6 mois de post-ischémie, les surfaces cellulaires sont plus faibles dans les deux groupes avec des valeurs $55,31 \pm 3,44 \mu\text{m}^2$ dans le groupe sham et $43,20 \pm 2,54 \mu\text{m}^2$ dans le groupe ischémié (* $p < 0,05$).

Les autres régions étudiées, à savoir les régions CA3, CA4 et du gyrus denté ne montrent pas de différence entre les deux groupes sur les 4 premiers mois de l'étude.

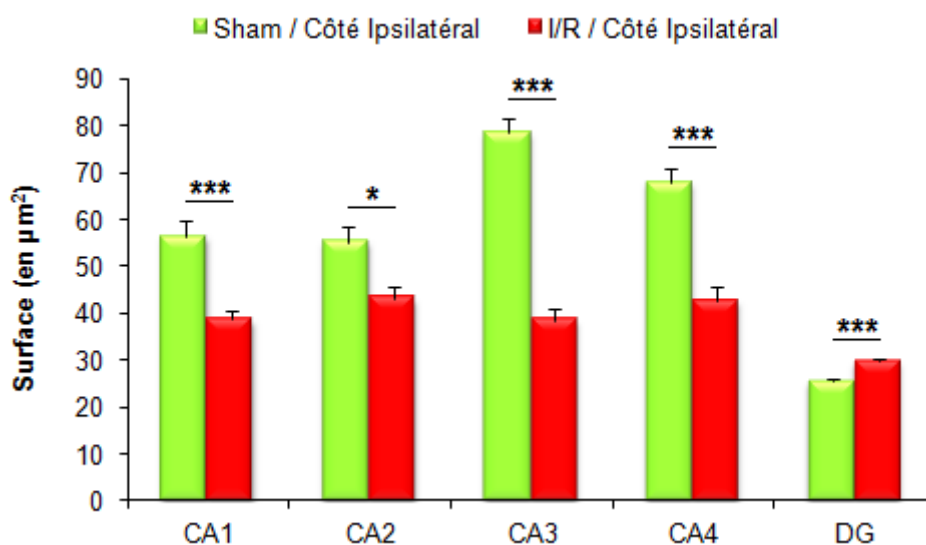


Figure 95 : Evolution de la surface cellulaire de toutes les zones étudiées dans la région de l'hippocampe ipsilatéral dans les deux groupes de rats à 6 mois de post-ischémie. Sham CA1 n=60 ; I/R CA1 n=60 ; Sham CA2 n=60 ; I/R CA2 n=60 ; Sham CA3 n=60 ; I/R CA3 n=60 ; Sham CA4 n=60 ; I/R CA4 n=60 ; Sham DG n=150 ; I/R DG n=150. * $p < 0,05$ vs groupe sham, ** $p < 0,005$ vs groupe sham, *** $p < 0,000$ vs groupe sham.

A 6 mois de post-ischémie, la surface cellulaire dans les zones CA est inférieure chez les rats ischémiés en comparaison au groupe sham (figure 95). Dans la zone CA3, la surface est de $78,49 \pm 3,28 \mu\text{m}^2$ chez les rats sham alors qu'elle n'est que de $38,59 \pm 2,64 \mu\text{m}^2$ au sein du groupe ischémié (** $p < 0,000$). Au sein de la zone CA4, les résultats sont sensiblement identiques ($67,91 \pm 3,21 \mu\text{m}^2$ vs $42,74 \pm 3,11 \mu\text{m}^2$; *** $p < 0,000$).

Dans la région du gyrus denté, les résultats sont inverses et la surface cellulaire est augmentée dans le groupe de rats ischémiés, $29,72 \pm 0,54 \mu\text{m}^2$ alors que celle-ci est diminuée chez les rats sham ($25,47 \pm 0,66 \mu\text{m}^2$; *** $p < 0,000$).

IV.5. Taux d'expression de l'ARNm

Le taux d'expression de l'ARNm du BDNF au sein du cortex des animaux ischémiés ne met pas en évidence de différence significative d'expression malgré une tendance à une diminution à 4 et 6 mois de post-ischémie (figure 96).

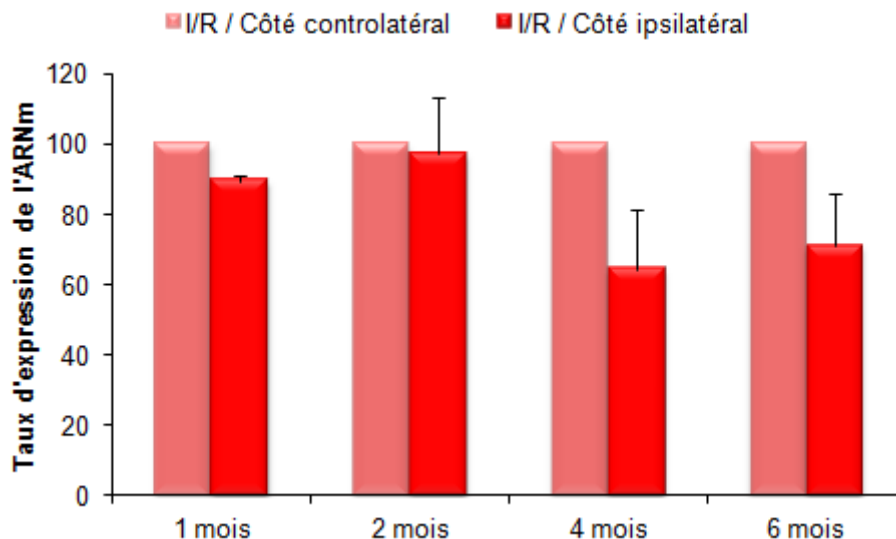


Figure 96 : Taux d'expression de l'ARNm du BDNF au sein des cortex

Au niveau des hippocampes, l'expression de l'ARNm du BDNF est semblable des deux côtés chez les rats ischémiés à 1 mois de post-ischémie. Dès 2 mois de post-ischémie et jusqu'à la fin de l'étude, les résultats montrent une tendance à une diminution de l'expression au sein de l'hippocampe ipsilatéral. Cependant, cette tendance n'est pas statistiquement significative (figure 97).

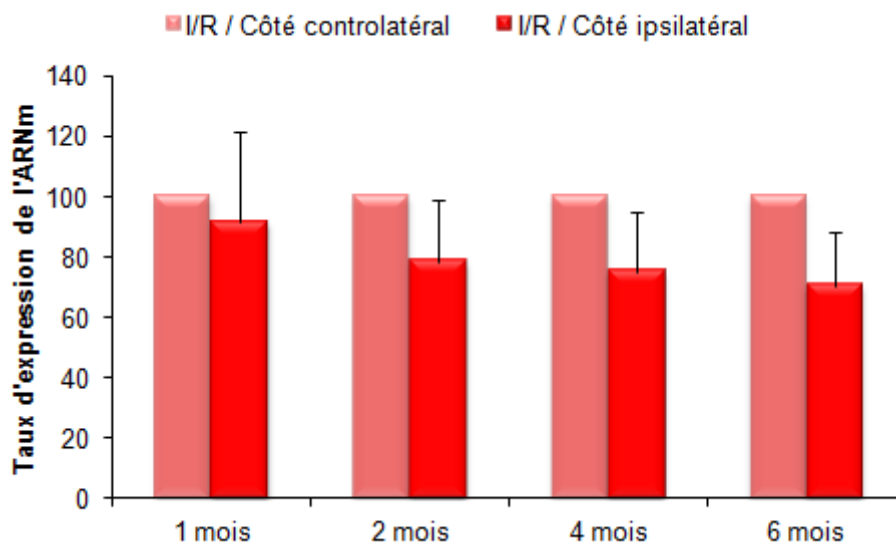


Figure 97 : Taux d'expression de l'ARNm du BDNF au sein des hippocampes

L'expression de l'ARNm de l'APP ne montre aucune différence entre les rats sham et les rats ischémiés quelque soit la zone testée, à savoir le cortex et l'hippocampe.

Discussion

I. Résumé des résultats

Le processus d'ischémie cérébrale engendre des conséquences irréversibles dès les premières secondes et jusqu'à des mois après la survenue de l'événement. Les études, principalement menées à court terme mettent en évidence de nombreux phénomènes délétères liés à la reperfusion. Spontanément, les patients récupèrent mais souvent partiellement de leurs déficits engendrés par l'AVC. Cette phase de récupération est une fenêtre dans laquelle la possibilité d'intervenir paraît essentielle afin d'améliorer le pronostic des patients. Pour cette raison, il est nécessaire d'étudier sur un plan préclinique les conséquences sur de longues périodes pour comprendre les phénomènes spontanés de récupération et de régénération et en dégager de nouvelles cibles thérapeutiques. Notre modèle d'étude repose sur l'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne chez le rat et a permis de constituer une base de données importante sur le suivi concomitant de 1 à 6 mois de post-ischémie des conséquences de l'ischémie cérébrale à la fois d'un point de vue lésionnel et d'un point de vue déficit moteur et cognitif.

Dans cette optique, notre étude s'est portée sur plusieurs aspects des dommages causés par l'ischémie-reperfusion cérébrale. Nous avons utilisé des techniques d'IRM afin de pouvoir suivre les lésions cérébrales sans avoir à sacrifier les animaux à des temps déterminés pour évaluer la lésion. Le volume d'infarctus total décroît fortement entre 24 heures et 7 jours de reperfusion pour se stabiliser jusqu'à 6 mois mais une différenciation de la lésion s'opère dès 7 jours en hyposignal et en hypersignal puis en cavité porencéphalique à partir de 1 mois de post-ischémie. L'étude des structures anatomiques met en évidence une atrophie cérébrale et plus particulièrement de l'hémisphère ipsilatéral ainsi qu'une augmentation du volume des ventricules au cours du temps. Par ailleurs, l'étude des ratios d'ADC montre des remodelages tissulaires au sein de certaines régions stratégiques comme le noyau caudé et le cortex pariétal tandis que le thalamus ne semble pas affecté.

Afin de corrélérer notre modèle expérimental aux observations cliniques, une batterie de tests comportementaux couvrant plusieurs aspects fonctionnels a été employée. L'étude des conséquences motrices a montré une récupération importante. Le test de l'actimètre révèle une hypoactivité à 1 mois de post-ischémie des rats ischémiés-reperfusés devenant une hyperactivité à 6 mois de post-ischémie. Le test du cylindre vide ne permet pas de différencier les deux groupes sham et I/R quant à l'utilisation préférentielle d'une patte au détriment de l'autre. En revanche, la dextérité fine (test de l'escalier) reste perturbée chez les rats I/R tout au long de notre étude jusqu'à 4 mois de post-ischémie. Plusieurs corrélations sont mises en évidence, d'une part, une corrélation positive est observée entre

l'augmentation du ratio de l'ADC correspondant au cortex contrôlant la patte avant et l'utilisation de celle-ci, d'autre part entre le volume de la lésion totale et le pourcentage d'utilisation de cette patte avant, et ce, quelque soit le temps d'étude. Toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence de densité cellulaire dans cette zone qui pourrait expliquer ce déficit.

Le deuxième versant de notre étude comportementale s'est focalisé sur les capacités mnésiques au décours de l'ischémie-reperfusion. Différents types de mémoire sont successivement altérés. La mémoire à long terme étudiée par le test de l'évitement passif est transitoirement affectée à 1 mois de post-ischémie dans le groupe de rats ischémiés-reperfusés. A plus long terme, la mémoire de travail (test de l'alternance spontanée) et la mémoire de référence spatiale (test de la piscine de Morris) sont significativement perturbées à 6 mois de post-ischémie au sein du groupe I/R.

Pour mieux comprendre ces déficits mnésiques, nous avons recherché quels mécanismes pouvaient être responsables. La quantification volumique de régions de la boucle trisynaptique impliquées dans les processus mnésiques met en évidence une atrophie de l'hippocampe et du cortex entorhinal ipsilatéral en comparaison au côté controlatéral chez les rats I/R. Au sein de ces zones, le ratio ADC augmente de façon progressive avec une corrélation négative entre le ratio au niveau de l'hippocampe et le score obtenu lors du test de l'alternance spontanée. D'autres régions impliquées dans les processus de mémorisation sont structurellement perturbées telles que la région du corps calleux ainsi que l'amygdale. L'étude histologique de ces zones ne révèle pas de différence entre les deux groupes (sham et I/R) d'un point de vue densité cellulaire. En revanche, dans la région de l'hippocampe nous avons mis en évidence une diminution de la surface cellulaire au décours du temps au sein de la Corne d'Ammon qui peut expliquer l'atrophie de cette zone. Les mécanismes moléculaires explorés suggèrent toutefois l'implication du facteur neurotrophique BDNF puisque son expression tend à diminuer au cours du temps au sein de l'hippocampe ipsilatéral des rats ischémiés-reperfusés. Par ailleurs, l'expression de l'ARNm de l'APP, marqueur de dégénérescence de type Alzheimer ne varie pas au cours du temps.

Nous allons discuter nos résultats selon deux grands axes. Le premier concerne la récupération fonctionnelle motrice et la plasticité cérébrale, le deuxième portera sur le déficit mnésique et l'atrophie hippocampique et corticale.

II. Plasticité cérébrale et récupération fonctionnelle motrice

II.1. Remodelage tissulaire post-ischémique

L'imagerie par IRM a permis de suivre les lésions durant l'entièreté de l'étude. Jusque là, de nombreux travaux se sont basés sur des résultats histologiques pour quantifier les volumes lésionnels mais il est maintenant établi qu'il est possible de corrélérer les résultats d'IRM et d'histologie (Jacobs *et al*, 2001). Une première observation globale montre une atrophie du cerveau observée chez les rats ischémiés dès 1 mois et jusqu'à 6 mois de post-ischémie, retrouvée dans d'autres études (Ding *et al*, 2010) et localisée plus précisément au niveau de l'hémisphère ipsilatéral, siège de la lésion initiale (Ten *et al*, 2004 ; Ding *et al*, 2010) avec une épaisseur corticale variant selon la localisation au sein du cerveau (Karl *et al*, 2010). A l'inverse, l'hémisphère controlatéral n'est pas touché. La localisation de l'infarctus suite à une MCAO dans nos conditions expérimentales est similaire à ce qui est rapporté dans la littérature et touche les zones situées entre 4,20 mm en amont et 5,20 mm en aval du bregma (Virley *et al*, 2000 ; Roof *et al*, 2001 ; Bouet *et al*, 2007). Notre travail a montré un volume d'infarctus total diminuant entre 24 heures (notre premier point de suivi, prédictif de la lésion totale à 6 mois de post-ischémie) et 7 jours de reperfusion. Le lendemain de la reperfusion, la présence de l'œdème augmente considérablement le volume de l'hémisphère lésé comparativement à l'hémisphère controlatéral. La diminution du volume d'infarctus durant la première semaine est liée à la résolution spontanée de cet œdème et est retrouvée dans plusieurs études, même en présence de volumes d'infarctus plus importants dus à des temps d'occlusion supérieurs (Virley *et al*, 2000 ; Plaisier *et al*, 2008b ; Karki *et al*, 2010). A partir de 7 jours, le volume de la lésion totale se stabilise et n'évolue plus de manière significative jusqu'à 6 mois de post-ischémie. Cette stabilisation est déjà effective à 1 mois de post-ischémie (Virley *et al*, 2000) et le reste jusqu'à 1 an de post-ischémie (Karki *et al*, 2010).

Si le volume lésionnel est stable dans les mois qui suivent l'ischémie-reperfusion, en revanche la qualité du tissu dans la zone infarctée évolue. La lésion ischémique se différencie dès 7 jours de reperfusion avec l'apparition simultanée d'un hyposignal (révélateur d'un tissu plus dense) et d'un hypersignal (révélateur d'un tissu moins dense) observés en séquence anatomique T2.

Le signal hypodense observé en séquence T2 peut être associé à des processus inflammatoires. L'ischémie cérébrale entraîne une réponse inflammatoire importante dès la phase aiguë, associée à des modifications de la paroi vasculaire, par une expression des molécules d'adhésion permettant le recrutement des polynucléaires neutrophiles et leur

migration transendothéliale vers le parenchyme cérébral où ils vont libérer des cytokines. Cette infiltration dans les premières heures suivant l'ischémie va majorer les phénomènes de stress oxydant via l'induction de la NOS II (Gavins *et al*, 2007). Cette réponse inflammatoire se poursuit pendant la période chronique jusqu'à des temps tardifs. Sekeljic *et al* (2012) ont observé la présence de cellules inflammatoires lymphocytaires et de macrophages 1 an après l'ischémie-reperfusion. Ces derniers étaient essentiellement situés dans le striatum. Plusieurs travaux ont prouvé que ce signal correspondait au développement d'une astrogliose participant à la formation de la cicatrice gliale (Bouet *et al*, 2010) et à une accumulation de macrophages (Weber *et al*, 2005 ; Karki *et al*, 2010). La présence de ces cellules inflammatoires est décelable par le suivi en séquence T2 d'un hyposignal, révélateur d'un tissu plus dense. Dans notre modèle, cet hyposignal est détecté dès 7 jours de reperfusion et est également majoritairement présent au sein du striatum. Nous avons pu déterminer sa cinétique au cours du temps avec un volume maximum atteint à 1 mois de post-ischémie qui décroît jusqu'à un niveau de stabilisation à 4 mois de post-ischémie. Des valeurs comparables sont retrouvées dans une étude menée sur l'hypoxie sur un modèle de rats (Letourneur *et al*, 2012). Les études immunohistochimiques ont démontré un co-marquage entre les macrophages et le fer révélé par la coloration de Perl's (Weber *et al*, 2005 ; Justicia *et al*, 2008 ; Karki *et al*, 2010). Ce résultat a été confirmé à 10 semaines dans un autre travail sur les suivis des mécanismes inflammatoires post-ischémiques par des techniques d'IRM et d'histologie. Dans cette étude, Weber *et al* (2005) en utilisant une séquence d'IRM spécifique, la SWI, ont mis en évidence la présence de sites d'accumulation de fer dans les tissus sous forme de signal dans les tons noirs, particulièrement dans la région du noyau caudé, qui colocalisaient avec un marquage ED-1 spécifique des macrophages. Cette colocalisation peut s'expliquer par l'accumulation initiale de fer suite à l'ischémie qui va engendrer des phénomènes délétères en participant au stress oxydant via la réaction de Fenton. Dans un second temps, le fer peut participer à l'oligomérisation des protéines responsables des maladies neuro-dégénératives telles que l'A β (Bartzokis *et al*, 2007) puisque l'APP est surexprimé au sein des astrocytes le long de la cicatrice gliale (Popa-Wagner *et al*, 1998).

II.2. Récupération fonctionnelle

L'hypersignal présent au sein de la lésion ischémique décroît progressivement au fil des mois. Il reflète l'apparition d'une nécrose des tissus touchés menant à une perte de tissu et formant une cavité porencéphalique composée de LCR dès 1 mois de post-ischémie. Ces cavités situées au cœur de la zone ischémisée résulte de la perte d'intégrité des cellules par des mécanismes nécrotiques. Plus le volume de la lésion initiale est important, plus ces cavités sont présentes et importantes puisque le volume de la lésion à 24 heures est prédictif

du volume de ces cavités à 6 mois de post-ischémie. Ce phénomène de cavitation a été retrouvé à 28 jours dans un modèle similaire chez des rats adultes (Virley *et al*, 2000) ou 2 mois après une hypoxie chez des rats nouveau-nés (Ten *et al*, 2004). La perte de tissu est évaluée à 32 % environ sur le volume de l'hémisphère ipsilatéral à 1 et 2 mois de post-ischémie (Freret *et al*, 2006 ; Bouet *et al*, 2007). La présence de ces cavités est significative chez les rats sujets au modèle de MCAO mais détectables seulement si les animaux sont gardés au minimum quelques semaines après l'induction de l'ischémie ou d'autres troubles tels que l'hypoxie. Toutefois, ces cavités porencéphaliques sont également détectées chez l'homme et chez l'enfant dans d'autres pathologies comme les traumatismes crâniens (Yang *et al*, 1997) ou les infections (Ryzenman *et al*, 2007 ; Tuzun *et al*, 2010).

La mesure de l'ADC a été utilisée comme paramètre pour étudier les modifications d'architecture cellulaires suite à l'ischémie-reperfusion. Ses variations reflètent les modifications du degré de liberté de mouvement de l'eau dans l'espace extracellulaire. Virley *et al* (2000) ont suivi l'évolution de l'ADC dans les 28 jours suivant l'ischémie mettant en évidence une diminution de sa valeur dans les 7 premiers jours reflétant la perte d'espace extracellulaire due à l'œdème suivie d'une stabilisation transitoire à 7 jours, puis d'une augmentation progressive durant la phase chronique traduisant la transformation du tissu en cavités remplies de LCR. Dans notre étude sur des temps de post-ischémie de 6 mois, nous avons observé que le volume de ces cavités continuait à augmenter prouvant que ces mécanismes de transformation de tissus persistaient de manière chronique. Plusieurs régions d'intérêt ont été ciblées pour observer d'éventuels changements sur la base de l'étude des ratios d'ADC au sein du noyau caudé (ganglions de la base) et du cortex pariétal. Ce ratio a tendance à être augmenté à 1 mois de post-ischémie soulignant un tissu moins dense au sein de ces régions et significatif à partir de 4 mois de post-ischémie tandis que le thalamus (système limbique) n'est pas affecté par ces variations. Le noyau caudé et le cortex pariétal sont des zones fortement touchées par l'ischémie-reperfusion et sont par conséquent souvent converties en cavités porencéphaliques. Celles-ci se retrouvent parfois confondues avec les ventricules, c'est pourquoi nous avons suivi en parallèle leur évolution révélant une augmentation du volume des ventricules latéraux et du 3^{ème} ventricule au décours de l'ischémie-reperfusion indépendamment de la présence de cette cavité confondue. Cette augmentation est observée dans les deux hémisphères du cerveau avec une prévalence plus élevée pour le côté ipsilatéral dès 1 mois de post-ischémie et ce jusqu'à 6 mois, corroborée dans d'autres études par l'augmentation du ratio ipsi/controlatéral de 24 heures ($0,7 \pm 0,2$) à 1 an de post-ischémie ($2,4 \pm 0,7$). Cette augmentation reflèterait une perte de tissu localisée en pourtour de ce ventricule (Virley *et al*, 2000 ; Karki *et al*, 2010).

L'étendue de ces lésions constatée au décours d'une ischémie-reperfusion et touchant plusieurs régions primordiales dans le fonctionnement du cerveau nous a incité à déterminer quels peuvent être les déficits engendrés par de telles lésions afin de corrélérer notre modèle aux observations cliniques. Dans cette optique, une batterie de tests comportementaux a été employée couvrant plusieurs aspects fonctionnels. A court terme, les déficits moteurs observés sont nombreux, et visibles dès 24 heures de reperfusion avec un score neurologique reflétant un déficit modéré à sévère (Kraft *et al*, 2010 ; Crumrine *et al*, 2011), une inaptitude à avoir une coordination motrice sur le rotarod (Plaisier *et al*, données non publiées) ou encore des difficultés à sentir et retirer les morceaux d'adhésif sur les pattes avant (Plaisier *et al*, 2008b). Par la suite, une récupération s'observe dès 7 jours de reperfusion avec une amélioration dans les performances aussi bien motrices que sensibles. Cependant, certains effets moteurs de l'ischémie sont toujours présents à long terme (Karki *et al*, 2010).

Concernant la motricité générale, les rats ischémiés présentent une hypoactivité à 1 mois de post-ischémie visualisée par une moindre distance parcourue et corrélée à une vitesse moyenne de déplacement plus faible dans le test de l'actimètre. Cette baisse peut s'expliquer par la difficulté qu'ont les rats ischémiés à récupérer de l'opération puisqu'ils s'alimentent moins bien dans les jours suivants. A l'inverse, à 6 mois de post-ischémie, les rats ischémiés présentent une hyperactivité accompagnée d'une vitesse moyenne supérieure aux rats sham. Elle a été observée dans d'autres modèles. Dans un modèle d'hypoxie sur ratons, une hyperactivité est présente à 1 mois, reflétée par un nombre de redressements supérieur aux ratons sham (Letourneur *et al*, 2012). A 3 mois de post-ischémie, ce résultat est retrouvé dans un modèle d'occlusion bilatérale des carotides chez la souris avec une distance totale augmentée dans ce groupe après 10 minutes d'exploration en comparaison avec les souris sham (Nishio *et al*, 2010). Cette hyperactivité est perçue jusqu'à 1 an après l'épisode ischémique (Jablonski *et al*, 2010). Cependant, les raisons de cette hyperactivité sont méconnues à ce jour.

Pour affiner cette étude de déficit moteur nous avons mis en place deux tests, le test du cylindre et le test de l'escalier, décrits comme permettant d'apprécier des déficits fins non détectables par le rotarod ou l'actimètre. Notre étude ne révèle pas de différence quant à l'utilisation préférentielle d'une patte avant au détriment de l'autre pour toucher la paroi dans le test du cylindre malgré une légère tendance à 1 mois de post-ischémie. Ces résultats diffèrent d'une autre étude où une utilisation significativement plus fréquente de la patte ipsilatérale est détectée dans le même modèle de 7 jours à 1 mois de post-ischémie avec une corrélation entre le volume d'infarctus total à 1 mois de post-ischémie et le score d'asymétrie au cylindre (Roof *et al*, 2001). Toutefois, il s'agissait d'un modèle permanent

d'occlusion et d'un modèle transitoire de 90 minutes couplé à une occlusion bilatérale des carotides, modèles entraînant une ischémie beaucoup plus drastique ce qui peut expliquer les différences obtenues avec notre étude. Cette évaluation de la dextérité par le test du cylindre ne semble finalement pas adaptée à une détection à long terme puisqu'un travail récent sur un modèle de MCAO montre une récupération spontanée très significative à 14 jours de reperfusion (Zvejniece *et al*, 2012).

Le test de l'escalier, pertinent pour étudier la dextérité fine, a été réadapté pour notre étude car un apprentissage avant l'opération n'est pas adéquat pour restituer la tâche quelques mois après. De plus, les temps de référence de notre étude sont plus longs en comparaison aux données de la littérature bien que les rats à 6 mois de post-ischémie ne puissent effectuer ce test en raison de leur taille. De 1 à 4 mois de post-ischémie, un déficit significatif de dextérité de la patte controlatérale est présent chez les rats ischémiés-reperfusés. La phase d'apprentissage révèle un nombre moins important de granules attrapés et mangés et la phase de test révèle une utilisation plus fréquente de la patte ipsilatérale pour attraper et manger les granules au détriment de la patte controlatérale. Ces résultats sont corroborés par une étude réalisée sur un modèle identique menée à 1 et 2 mois de post-ischémie (Freret *et al*, 2006). D'autres travaux mettent en évidence un déficit des deux pattes avec une prévalence plus élevée pour la patte controlatérale à 1 mois de post-ischémie (Virley *et al*, 2000) ce qui est en contradiction avec nos résultats. Cependant, l'ischémie est plus longue (90 min) que dans notre modèle et peut expliquer ce déficit supplémentaire. Concernant le nombre de granules mangés, nos travaux démontrent que la majorité des granules attrapés est mangée ce qui n'est pas retrouvé dans l'étude de Freret *et al* (2006) où à 2 mois de post-ischémie, le nombre de granules mangés est quasi inexistant (Freret *et al*, 2006).

Ces résultats comportementaux démontrent uniquement un déficit persistant au niveau de la dextérité fine alors que le volume des cavités porencéphaliques est tel que des régions corticales entières sont irrémédiablement nécrosées et par conséquent « disparaissent » de l'hémisphère ipsilatéral. Ces observations suggèrent des mécanismes de compensation ipsi ou controlatérale qui vont permettre de restaurer tout ou partie de ces fonctions. Par IRM, il est possible de suivre les réarrangements s'opérant au sein du cerveau au décours d'une ischémie-reperfusion. L'injection de Manganèse (Mn^{2+}) au sein d'une région corticale touchée, permet de suivre son parcours au sein des neurones puisqu'il est assimilé par ceux-ci comme le Ca^{2+} et est par conséquent transporté le long des axones et à travers les synapses (Pautler *et al*, 1998). Son suivi permet de reconstituer des cartes témoignant des connexions neuronales encore existantes au décours d'une ischémie (Allegrini & Wiessner, 2003 ; Pautler, 2004). Cependant, ces processus récupérateurs se

déroulent en plusieurs phases. Dans les premiers jours suivant l'ischémie-reperfusion, l'hémisphère ipsilatéral étant dysfonctionnel suite à la lésion, c'est l'hémisphère controlatéral, et notamment les zones « miroirs » qui vont intervenir pour effectuer les tâches demandées. Dès le lendemain de l'ischémie, l'index de latéralité, correspondant à une activation augmentée de la réponse de l'hémisphère controlatéral est observée jusqu'à 3 jours de reperfusion (Dijkhuizen *et al*, 2003). A 2 jours de reperfusion, suite à un stimulus au niveau de la zone sensori-motrice infarctée, l'activité neuronale controlatérale est augmentée (Takatsuru *et al*, 2009). Dès 2 semaines, une injection au sein du cortex sensori-moteur entraîne une baisse de la rétention de Mn^{2+} au sein de régions connectées avec ce cortex tels que le noyau caudé, la substance noire et le thalamus (Van Der Zijden *et al*, 2007). Or, ces zones sont particulièrement touchées dans notre modèle ce qui suggère que l'hémisphère controlatéral prend le relais par le biais de connexions et permet la récupération spontanée notamment au niveau de la locomotion (actimétrie) et de l'utilisation préférentielle de la patte ipsilatérale (test du cylindre). En parallèle à ces déficits, Dijkhuizen *et al* (2003) ont montré une corrélation inverse entre l'index de latéralité et le score neurologique, à 2 semaines de post-ischémie, signifiant une restauration des fonctions au sein de l'hémisphère ipsilatéral. A plus long terme, à 4 et 10 semaines de post-ischémie, lorsque les désordres fonctionnels sont dans la phase de récupération, les résultats diffèrent et le renforcement de la présence des ions Mn^{2+} est visible au sein de nouvelles régions bilatérales. Ainsi, des connexions sont établies entre la zone péri-lésionnelle et l'infarctus mais également entre la zone péri-lésionnelle et l'hémisphère controlatéral (Van Der Zijden *et al*, 2008b) ou entre le striatum ipsilatéral et le cortex controlatéral et entre la zone péri-lésionnelle et le cortex controlatéral (Napieralski *et al*, 1996 ; Carmichael, 2003 ; Takatsuru *et al*, 2009) ou entre la zone péri-lésionnelle et le cortex ipsilatéral (Carmichael *et al*, 2001) par un transport du Mn^{2+} au niveau du corps calleux permettant de restaurer les fonctions quelques semaines après l'ischémie.

En lien avec le test de l'escalier, le ratio ADC correspondant à la région du cortex contrôlant la patte avant est augmenté dès 1 mois et de manière significative à 4 mois de post-ischémie signifiant un tissu plus lâche du côté ipsilatéral. Ce ratio est corrélé positivement à l'utilisation de la patte avant ipsilatérale durant l'entièreté de l'étude. De même, une corrélation a été établie dans notre travail et corroborée par d'autres entre le volume de la lésion totale et le résultat au test de l'escalier. Ceci peut s'expliquer par la progression de l'ischémie qui touche initialement le cortex contrôlant la patte avant et qui progresse à tous les temps de post-ischémies étudiés (Virley *et al*, 2000 ; Freret *et al*, 2006). En parallèle, des études ont montré une réorganisation des connexions lorsque cette zone est touchée par l'ischémie. Quelques heures après l'ischémie-reperfusion, des

réarrangements s'opèrent dans cette zone afin de répondre à un stimulus. Par la suite, une restauration des fonctions passe par l'établissement de connexions avec des zones péri-lésionnelles comprenant notamment le cortex contrôlant la patte arrière. Cependant, le temps de réponse est sensiblement augmenté lors d'un stimulus en raison de l'allongement du trajet de connexions (Brown *et al*, 2009 ; Sigler *et al*, 2009). Toutefois, les infarctus induits dans ces études sont très focalisés, ne touchant que le cortex contrôlant la patte avant et étudiés au travers d'un stimulus réflexe de cette patte. Notre travail a lui été effectué sur un modèle MCAO qui touche un territoire majeur, pouvant expliquer la persistance du déficit de la dextérité par le test de l'escalier qui nécessite une intégration de la tâche à accomplir.

Afin d'expliquer ces résultats, nous avons analysé la densité cellulaire au sein de la zone du cortex contrôlant la patte avant sans résultat significatif quant à une baisse de cette densité cellulaire au cours de notre étude.

Toutefois, notre travail ne peut déterminer le type cellulaire présent au sein du tissu ischémié. Les réarrangements axonaux démontrés précédemment dans la littérature sont confirmés au niveau ipsilatéral dans la zone péri-lésionnelle, par la présence de cônes de croissance qui sont décelés jusqu'à 4 semaines après l'ischémie, suivi par la détection de synapses matures entre 14 et 60 jours (Stroemer *et al*, 1995). Au sein de l'hémisphère controlatéral, la présence de ces dernières est également détectée jusqu'à 2 mois de post-ischémie (Stroemer *et al*, 1995).

En conclusion de ces déficits moteurs, notre modèle permet de démontrer au cours du temps l'absence de handicap majeur. La motricité générale n'est affectée qu'à court terme (1 mois), avec une récupération au cours de la phase chronique. Aucune utilisation préférentielle n'est détectée au niveau des pattes avant. En revanche, la dextérité fine de la patte controlatérale est affectée tout au long de notre étude. En comparant ces résultats obtenus au début de la phase chronique de l'AVC, nos données précliniques sont proches des données cliniques. L'index de Barthel est le test utilisé chez l'homme qui se rapproche le plus des tests précliniques puisque ses items regroupent des gestes simples mais qui nécessitent néanmoins de la dextérité tels que couper ses aliments, se raser, nouer ses lacets... A 3 mois après la survenue d'un AVC, ce test indique que 18 % des patients ne sont plus autonomes et 23 % requièrent une aide pour les gestes du quotidien (NINDS, 1995). Or dans notre modèle, le seul déficit perdurant est la dextérité fine (les rats ischémiés n'utilisent qu'à 30 % leur patte controlatérale) ce qui peut s'apparenter au déficit mis en évidence par l'index de Barthel.

III. Des perturbations mnésiques à la démence

III.1. L'ischémie-reperfusion cérébrale est responsable de déficits mnésiques

Les déficits de mémoire constituent un handicap important chez les patients ayant subi un AVC. Selon les études cliniques réalisées, les déficits mnésiques peuvent toucher différents types de mémoire, évoluer dans le temps et sont souvent associés à la survenue de la démence qui touche un pourcentage non négligeable de patients à des temps plus ou moins tardifs par rapport à l'accident ischémique. Expérimentalement, différents tests de mémoire ont été développés en fonction du type de mémoire à évaluer mettant en évidence plusieurs types de déficits à des temps de post-ischémie différents.

La mémoire à long terme étudiée par le test de l'évitement passif est transitoirement affectée à 1 mois de post-ischémie suivie d'une récupération spontanée puisqu'à 2, 4 et 6 mois de post-ischémie, les performances des rats I/R rejoignent celles des rats sham. Aucune étude, utilisant ce test, n'a été réalisée à notre connaissance dans la phase chronique de l'ischémie. En revanche, à des temps plus précoces, 24 heures, 7 ou 15 jours de reperfusion dans un modèle d'ischémie globale ou 1 mois dans un protocole d'hypoxie un déficit est observé (Karalis *et al*, 2011 ; Li *et al*, 2011 ; Zvejniece *et al*, 2012). Li *et al* (2011) ont mis en relation ce déficit avec la perte neuronale observée dans la région CA1 de l'hippocampe, précocément et fortement touchée lors de l'ischémie.

A distance de l'induction de l'ischémie, la mémoire de travail est altérée de manière tardive puisque le déficit est présent uniquement à 6 mois de post-ischémie, par rapport aux animaux sham même si les résultats montrent une diminution progressive significative de la performance entre 1 et à 6 mois de post-ischémie chez les rats I/R. A des temps précoces (14 jours de post-ischémie) aucune modification n'est observée entre les animaux sham et I/R (Zvejniece *et al*, 2012). Un nombre significatif de données sur la mémoire de travail ont été obtenues avec d'autres tests comme le test du labyrinthe en T ou du labyrinthe en étoile avec lesquels des déficits ont été mis en évidence à partir de 5 mois de post-ischémie dans des modèles d'arrêt cardiaque (Kiryk *et al*, 2011) ou d'occlusion bilatérale des carotides (Nishio *et al*, 2010). Ces deux tests sont plus sensibles dans la détection des perturbations de la mémoire de travail que l'alternance spontanée. Cependant, ils nécessitent tous les deux un apprentissage qui n'était pas compatible avec notre protocole expérimental.

Afin de confirmer ce résultat de dysfonctionnement mnésique tardif, nous avons utilisé sur un autre groupe de rats à 6 mois de post-ischémie, le test de la piscine de Morris,

permettant de tester la mémoire de référence spatiale typiquement associée à l'hippocampe. Différents constats ont été mis en évidence chez les rats I/R comparés aux rats sham. Durant la phase d'apprentissage, le temps de latence pour atteindre la plate-forme est augmenté au sein du groupe ischémié-reperfusé. Lors de la phase de test, les rats I/R passent indifféremment le même temps au sein des quatre quadrants de la piscine. A l'opposé, les rats sham, ayant mémorisé l'emplacement de la plate-forme, passent significativement plus de temps dans le quadrant cible et moins de temps dans le quadrant jouxtant ce dernier. De plus, le nombre de croisements de la plate-forme lors de cette phase de test est moindre en comparaison du groupe sham. Le temps de latence pour atteindre la zone de la plate-forme le jour du test a tendance à être augmenté chez les rats ischémiés-reperfusés sans toutefois être significativement différent. La vitesse moyenne développée par les deux groupes est identique ce qui exclut un problème locomoteur des rats ischémiés. Toutes ces observations sous-tendent un déficit de la mémoire de référence spatiale. Plusieurs études confirment un déficit mnésique à 6 mois après un traumatisme mais les items diffèrent selon les modèles. 6 mois après une ischémie induite par un arrêt cardiaque, des résultats identiques aux nôtres sont retrouvés à savoir, une latence augmentée lors de la phase d'apprentissage et moins de temps passé dans le quadrant cible lors de la phase de test (Langdon *et al*, 2008 ; Kiryk *et al*, 2011). Un autre test utilisé dans l'évaluation de la mémoire de référence, le test du labyrinthe de Barnes met en évidence un déficit de cette mémoire à 6 mois de post-ischémie dans un modèle d'occlusion bilatérale des carotides. Le temps passé autour du trou cible est plus élevé chez le groupe sham en comparaison avec le groupe ischémié-reperfusé ce qui est confirmé avec des protocoles portant sur des temps supérieurs de post-ischémie (Nishio *et al*, 2010). A 7 mois de post-ischémie, malgré une vitesse moyenne identique, les rats ischémiés présentent un défaut d'apprentissage, un nombre inférieur de croisements de la plate-forme cible lors de la phase de test ainsi qu'une latence augmentée pour atteindre cette plate-forme. A 12 mois de post-ischémie, l'apprentissage est toujours perturbé avec les rats ischémiés tandis que les résultats du test sont moins probants et ne mettent pas en évidence de différence entre les deux groupes (Karhunen *et al*, 2003). Résultat confirmé 18 mois après l'ischémie où l'effet de l'âge prévaut sur l'effet de l'ischémie et où il n'est plus possible de discriminer les groupes I/R ou sham par le test de la piscine de Morris (Kiryk *et al*, 2011). Toutefois, notre étude portant uniquement sur un temps de 6 mois de post-ischémie cela ne nous permet pas de déterminer la fenêtre d'apparition du déficit. D'autres études portant sur des temps plus courts ont permis de répondre à cette interrogation. 1 mois après la survenue de l'épisode, un déficit de la mémoire de référence spatiale est détecté au sein du groupe lésé, dans le cadre de l'ischémie (Dahlqvist *et al*, 2004) ou de l'hypoxie chez des ratons (Letourneur *et al*, 2012) persistant 2 mois après dans les mêmes modèles (Xiao *et al*, 2011 ; Karalis *et al*, 2012). Ces

résultats prouvent que la mémoire de référence est rapidement et irréversiblement altérée au décours d'une ischémie cérébrale.

Ces résultats démontrés chez le rongeur mettent en avant des déficits mnésiques avec une mémoire à long terme transitoirement affectée à 1 mois de post-ischémie et une mémoire de travail et une mémoire de référence spatiale affectées à 6 mois de post-ischémie apparaissant au décours de la phase chronique d'une ischémie-reperfusion. Ces résultats peuvent être rapprochés des études chez l'homme à savoir une augmentation de l'incidence de la démence parfois des années après la survenue de l'épisode ischémique (Leys *et al*, 2005). Plus en détail, les différents types de mémoire chez l'homme sont différemment altérés durant la période post-AVC mais rejoignent sur certains points notre modèle. A 1 an post-AVC, la mémoire à court terme pouvant s'apparenter à la mémoire de travail chez les animaux est affectée et touche 36,25 % des patients. A plus long terme, la mémoire épisodique présente un déficit entre 3 à 6 ans avant le diagnostic de démence (Jorm *et al*, 2005). Il semblerait que les déficits présents à long terme chez le rat reflètent des désordres plus complexes mais néanmoins bien présents chez l'homme même si la transposition doit être faite avec précaution.

III.2. Atrophies hippocampique et corticale responsables de la démence ?

Les mécanismes sous-jacents à la mise en place de ce déclin cognitif à long terme sont peu documentés. Différentes hypothèses, basées à la fois sur des données cliniques et précliniques, suggèrent des mécanismes communs avec les démences de type Alzheimer tels que l'activation de la cascade beta-amyloïde, une hypoperfusion cérébrale ou une atrophie progressive des régions hippocampiques fortement impliquées dans les processus de mémorisation (Gemmell *et al*, 2012, Pluta *et al*, 2012). Nous nous sommes particulièrement intéressés à cette dernière hypothèse et avons réalisé une quantification volumique de l'hippocampe et une mesure de l'épaisseur du cortex entorhinal. L'atrophie de l'hippocampe ipsilatéral apparaît au décours de l'ischémie cérébrale en comparaison avec le côté controlatéral chez les rats ischémiés dès 1 mois après l'opération et perdure jusqu'à 6 mois de post-ischémie. Ces résultats sont corroborés par d'autres travaux mettant en évidence l'apparition de cette atrophie dans différents modèles neuro-dégénératifs. A 2 mois de post-ischémie, une étude histologique a démontré une atrophie de l'hippocampe dans un modèle d'hypoxie chez le raton, que les animaux développent ou non des cavités porencéphaliques (Ten *et al*, 2004). De même, à 3 et 5 mois de post-ischémie, cette atrophie est quantifiable par IRM dans un modèle de MCAO chez le rat (Xie *et al*, 2011). Celle-ci perdure au-delà de notre temps d'étude puisqu'elle est présente chez des souris ischémiées

8 mois après l'occlusion bilatérale des carotides (Nishio *et al*, 2010) ou 9 mois après une ischémie induite par un arrêt cardiaque chez le rat (Langdon *et al*, 2008). En observant plus attentivement les plans de coupe en séquence T2, cette atrophie est naissante au niveau de l'hippocampe supérieur. D'autres études mettent en avant la localisation de cette atrophie au niveau de l'hippocampe dorsal se traduisant par un élargissement des ventricules latéraux à 1 an de post-ischémie (Jablonski *et al*, 2010). En parallèle au développement de cette atrophie, le ratio ADC augmente de façon progressive pour atteindre une significativité à 6 mois de post-ischémie ce qui traduit une perte de structure du tissu.

Nos résultats montrent également une atrophie du cortex entorhinal avec une diminution de son épaisseur du côté ipsilatéral au cours du temps chez les rats ischémiés en comparaison avec les rats sham. De plus, le ratio ADC montre une augmentation graduelle au sein de cette zone avec une significativité atteinte à 6 mois de post-ischémie. Nos résultats n'ont pas démontré de corrélation entre la diminution de l'épaisseur de cette région et le déclin cognitif, cependant, d'autres études mettent en avant son implication comme valeur prédictive d'un déclin cognitif et de la sévérité de la maladie d'Alzheimer sur 1 an de suivi (Velayudhan *et al*, 2012). Dans un modèle préclinique de lésions induites par une injection de NMDA au sein du cortex entorhinal, les résultats ont démontré l'implication de la couche dorsolatérale dans la restitution des tâches mnésiques tandis que la couche ventromédiane est impliquée dans les tâches émotionnelles telles que le labyrinthe surélevé (Steffenach *et al*, 2005). A l'inverse, une autre étude menée sur une ischémie prénatale ne met pas en évidence de différence quant à l'épaisseur du cortex entorhinal chez les rats ischémiés comme chez les rats sham lorsqu'ils atteignent l'âge adulte (Delcour *et al*, 2012).

III.3. Mécanismes cellulaires et moléculaires

La restitution des tâches mnésiques fait appel à des régions du cerveau également impliquées dans la motricité et précédemment décrites. Nous avons déjà discuté de l'augmentation progressive du ratio de l'ADC au sein du noyau caudé et du cortex pariétal (souvent transformés en cavités porencéphaliques) de 1 à 6 mois de post-ischémie tandis que le thalamus n'est pas affecté par ces changements. D'autres régions impliquées plus spécifiquement dans les processus de mémorisation sont structurellement perturbées telles que la région du corps calleux dès 1 mois de post-ischémie ainsi que l'amygdale à partir de 2 mois de post-ischémie. Ces observations couplées aux atrophies de l'hippocampe et du cortex entorhinal sous-tendent des changements de qualité tissulaire pouvant être expliqués au niveau cellulaire.

Deux hypothèses peuvent être suggérées pour expliquer cette atrophie et ces ratios ADC diminués : une densité cellulaire diminuée ou un changement morphologique des

cellules lié à une réduction du volume cellulaire. La coloration au crésyl violet que nous avons employée ne montre pas de différence significative quant à la densité cellulaire durant l'entièreté de l'étude dans les zones étudiées (CA et DG) même si une tendance à la diminution était observée au cours du temps. En revanche, la zone de l'hippocampe révèle la présence de quelques noyaux pycnotiques associés à un changement de morphologie cellulaire se traduisant par une surface cellulaire diminuée au niveau des zones CA1 et CA2 durant toute la période d'étude ainsi qu'une diminution de la surface cellulaire au sein des zones CA3 et CA4 à 6 mois de post-ischémie uniquement au sein de l'hémisphère ipsilatéral. Quant au DG, les surfaces cellulaires sont faiblement augmentées à 6 mois de post-ischémie. Les conséquences au niveau cellulaire énoncées peuvent expliquer les déficits mnésiques observés au sein du groupe I/R. Ces résultats sont néanmoins en contradiction avec d'autres travaux menés sur l'ischémie cérébrale. Dans un modèle d'ischémie induite par un arrêt cardiaque, la densité cellulaire est diminuée au sein de la région CA1 à 16 jours et 9 mois de post-ischémie (Langdon *et al*, 2008) avec une perte de la substance de Nissl de 30 à 80 %, 18 mois après l'arrêt cardiaque (Kiryk *et al*, 2011).

Cependant, nos investigations n'ont pas été plus précises, dans le sens où elles ne permettent pas de définir quel type de cellules est touché au sein de cette population cellulaire hippocampique. Sur ce sujet, plusieurs études apportent des résultats congruents aussi bien chez l'homme que chez l'animal à différents temps d'études. Sur la base d'un critère morphologique des cellules, à 2 mois de post-ischémie, une perte neuronale est quantifiée chez les rats au sein des régions CA1, CA2 et CA3 de l'hippocampe avec la présence de nombreux noyaux pycnotiques au sein des cellules (Xiao *et al*, 2011). A 5 mois de post-ischémie, cette perte neuronale n'est localisée qu'au sein de la région CA1 de l'hippocampe ipsilatéral concomitamment avec la présence de cellules apoptotiques (Xie *et al*, 2011). A 8 mois de post-ischémie, suite à l'occlusion bilatérale des carotides, de nombreux noyaux pycnotiques sont présents au sein de la région CA1 de l'hippocampe avec là encore, une augmentation des cellules en cours d'apoptose (Nishio *et al*, 2010). A 12 mois de post-ischémie, la perte cellulaire est présente dans la région CA1 mais également dans d'autres zones de l'hippocampe telles que les régions CA2, CA3 et CA4 qui sont pourtant moins vulnérables à l'ischémie (Jablonski *et al*, 2011). Enfin à 18 mois dans un modèle d'ischémie induite par arrêt cardiaque, une diminution de 50 à 100 % des cellules neuronales est observée dans la région CA1 en comparaison avec les rats sham (Kiryk *et al*, 2011). L'ensemble de ces résultats montre un effet temps-dépendant sur la perte neuronale dans la région de la corne d'Ammon et plus particulièrement en CA1.

De manière concomitante à cette perte neuronale, apparaît au décours du temps des cellules inflammatoires. A 3 mois de post-ischémie chez le rat, le suivi par IRM permet

de mettre en évidence une astrogliose au sein de la région de l'hippocampe ipsilatéral qui progresse dans le temps (Xie *et al*, 2011). En parallèle, une augmentation du nombre de cellules immunomarquées révélatrices de ce phénomène couplée à l'activation de la microglie et des macrophages est mise en évidence dans un modèle d'ischémie par arrêt cardiaque jusqu'à 18 mois compensant ainsi la perte neuronale au niveau du CA1 (Langdon *et al*, 2008 ; Kiryk *et al*, 2011).

Malgré les difficultés à transposer ces analyses chez l'homme, quelques études réalisées sur les cerveaux de patients mettent en évidence une diminution de la surface cellulaire neuronale dans les régions CA1 et CA2 chez des patients présentant des pathologies de type neurodégénératif tels que la démence vasculaire, la démence mixte ou la démence de type Alzheimer (Gemmell *et al*, 2012). Chez des patients ayant subi une occlusion de l'artère sylvienne, les résultats d'IRM 2 ans après la survenue de l'épisode ischémique mettent en évidence une perte neuronale au sein de l'hippocampe ipsilatéral avec en parallèle l'apparition d'une astrogliose (Xie *et al*, 2011). Nos résultats sont en accord avec la littérature concernant la vulnérabilité à l'ischémie de la région CA1 chez l'homme ou chez l'animal et qui est perturbée dans notre étude dès 1 mois de post-ischémie. En revanche, la région CA2 est précocement touchée alors que cette région est supposée résistante à l'ischémie à l'image des régions CA3 et CA4, elles aussi perturbées à 6 mois de post-ischémie. Toutefois, nos conclusions se portent uniquement sur la surface cellulaire et non sur le phénotype exact des cellules. Une étude immunohistochimique par des marqueurs spécifiques des neurones et des astrocytes est nécessaire pour conclure avec certitude sur le type cellulaire impliqué.

Afin d'expliquer ce phénomène d'atrophie hippocampique, nous avons étudié par des techniques de biologie moléculaire de Rt-PCR la présence du facteur neurotrophique BDNF au sein des régions hippocampiques et corticales. Le BDNF est une neurotrophine qui joue un rôle crucial dans la plasticité cérébrale et la réorganisation en termes de synaptogenèse, neurogenèse, aussi bien dans le cerveau sain qu'après une lésion. Il influence la prolifération des neurones, leur survie et leur différenciation (Ploughman *et al*, 2009). La majorité des études réalisées sur ce facteur neurotrophique montrent des différences d'expression à court terme dans le cadre de l'ischémie. L'expression de l'ARNm du BDNF est maximale à 6 heures de reperfusion au sein du gyrus denté des animaux ischémiés des deux côtés du cerveau mais cette élévation n'est que transitoire puisque dès 24 heures de reperfusion les taux sont identiques aux rats sham (Schmidt-Kastner *et al*, 2001). A 4 et 24 heures de reperfusion, les taux de BDNF cérébraux sont augmentés au sein des groupes ischémiés en comparaison au groupe sham alors qu'à 8 jours de reperfusion, plus aucune différence n'est visible (Béjot *et al*, 2011). A plus longue échelle, les résultats

dans un modèle MCAO mettent en évidence une réduction des taux de BDNF à 20 jours, au sein de l'hippocampe, des deux côtés en particulier dans les régions CA2, CA4 et du DG. En revanche, à 30 jours de post-ischémie, aucune différence n'est constatée au sein de ces mêmes zones ce qui sous-entend l'hypothèse que l'expression du BDNF est stimulée dans les premières phases de l'ischémie (Zhao *et al*, 2000), et diminuée à plus long terme. Nos résultats montrent une tendance à une baisse de l'ARNm du BDNF au cours du temps de 1 à 6 mois de post-ischémie du côté ipsilatéral en comparaison au côté controlatéral dans l'hippocampe et dans le cortex mais sans atteindre de différence significative. Néanmoins même si ces résultats nécessitent une confirmation en augmentant le nombre d'échantillons, ils constituent une piste intéressante pour essayer d'expliquer l'atrophie ipsilatérale hippocampique et corticale post-ischémique et les déficits mnésiques qui y sont liés. En effet, dans des modèles précliniques où la quantité de BDNF a été réduite par des moyens génétiques ou pharmacologiques, les animaux présentent des déficits d'apprentissage et de restitution dans le test de la piscine de Morris ou le labyrinthe en étoile (Yamada & Nabeshima, 2003).

Nous avons, par ailleurs, également mesuré l'ARNm de l'APP dans les régions hippocampiques et corticales dans les deux hémisphères sans observer de variations au cours du temps au décours de l'ischémie-reperfusion. Le débat sur l'implication de la cascade beta-amyloïde dans le processus dégénératif de l'ischémie est toujours ouvert avec des résultats contradictoires à la fois sur la présence ou non de marqueurs de cette cascade et sur le fait qu'ils soient la cause ou la conséquence des processus neurodégénératifs (Pluta *et al*, 2009 ; Nishio *et al*, 2010 ; Zhang *et al*, 2012). Les résultats préliminaires que nous avons obtenu quant à l'APP ne permettent pas, dans notre modèle, d'impliquer la toxicité de la cascade beta-amyloïde comme mécanisme pathologique de l'atrophie.

IV. Conclusion et Perspectives

Nos résultats montrent qu'il est possible de reproduire sur un modèle animal à long terme des caractéristiques de démence et de handicap fonctionnel comparables aux déficits retrouvés chez l'homme après un AVC. Sur l'ensemble des données présentées ici, il ressort que pour la poursuite de ce travail, certains outils expérimentaux semblent validés et d'autres sont à développer et/ou perfectionner. L'IRM est incontestablement un outil indispensable pour suivre l'évolution des lésions cérébrales dont nous n'avons pas encore exploité toutes les capacités. Nous pourrions suivre les lésions en les classant en lésion initiale qui perdure au cours du temps, en lésion touchée initialement mais qui récupère au cours du temps et en zone non ischémisée initialement mais touchée secondairement par l'ischémie. Pour apprécier les différents déficits à long terme, certains tests se sont révélés inappropriés comme le test du cylindre, en revanche le test du ruban adhésif et le test du coin apporteraient des informations supplémentaires sur les capacités sensori-motrices en complément du test de l'escalier. En définissant des groupes d'animaux spécifiquement dédiés à l'exploration motrice, nous pourrions suivre les mêmes rats sur plusieurs mois et étudier leur cinétique de récupération. Pour les déficits mnésiques, l'utilisation du labyrinthe en étoile et/ou du labyrinthe en T à la place du test de l'alternance spontanée serait plus discriminante. Par ailleurs, les atrophies ipsilatérales hippocampique et corticale que nous avons mises en évidence peuvent être un marqueur prédictif intéressant dans le pronostic de la démence post-ischémique et être utilisées comme critère d'évaluation de futurs traitements thérapeutiques. Pour cela elles doivent être étudiées de manière plus approfondie afin de comprendre les mécanismes sous-jacents et particulièrement en confirmant la baisse d'expression du BDNF. Une étude de spectroscopie par IRM et d'immunomarquage par des anticorps spécifiques des neurones ou des astrocytes des coupes de cerveaux de rats ischémisés permettraient de confirmer ou infirmer la perte neuronale et l'astrogliose au sein des cerveaux ischémisés.

Un certain nombre de pistes n'ont pas encore été exploitées en ce qui concerne : (i) le rôle bénéfique ou délétère à long terme de l'inflammation, pour lequel la présence de macrophages liés au fer au sein de la zone d'hyposignal doit être confirmée par immunomarquage et coloration de Perl's ; (ii) les mécanismes sous-tendant les capacités de récupération motrices des animaux ; (iii) l'implication de la cascade beta-amyloïde par une étude du rapport A β 1-40/A β 1-42 ainsi que de la protéine Tau dans les LCR prélevés lors du sacrifice afin d'effectuer une corrélation avec la présence de ces mêmes protéines au sein du tissu cérébral au décours du temps.

Ce travail s'inscrit dans une démarche d'étude transversale rejoignant l'étude clinique Strokedem en cours au CHRU de Lille et dont le but est de définir des facteurs pronostiques influençant positivement ou négativement, la survenue d'une démence au décours d'un premier accident vasculaire cérébral. Dans cette étude où 1100 patients seront suivis de manière régulière pendant 5 ans, de nombreux paramètres seront recueillis tels que facteurs de risque, antécédents, traitements. A chaque visite, les patients bénéficieront d'un examen neurologique et psychiatrique, d'une évaluation neuropsychologique, d'une IRM et de prélèvements sanguins qui permettront de suivre l'évolution de bio-marqueurs. Cette étude devrait permettre de démasquer des marqueurs prédictifs d'une démence post-AVC et notamment de vérifier la validité préclinique de l'atrophie hippocampique et corticale dans le développement de celle-ci.

Suite aux échecs récents des essais cliniques pour trouver un traitement durant la phase aigüe d'une ischémie cérébrale (Diener *et al*, 2008), de nouvelles possibilités peuvent se dessiner aujourd'hui au travers d'interventions durant la phase chronique qui pourraient stimuler les mécanismes de régénération et de réparation. Plusieurs pistes thérapeutiques sont envisagées et actuellement à l'étude au stade préclinique ou clinique. A titre d'exemples, le blocage de certaines voies de signalisation par immunothérapie notamment par un anticorps dirigé contre un inhibiteur de croissance axonale, le Nogo-A, a montré des résultats positifs quant à l'amélioration des performances motrices (Tsai *et al*, 2007) et mnésiques (Gillani *et al*, 2010) dans un modèle de rat ischémié, grâce à une croissance axonale et à une meilleure arborisation dendritique (Papadopoulos *et al*, 2006). La stimulation des voies dopaminergiques par administration de levodopa améliore la récupération motrice et sensorimotrice de rats ischémiés-reperfusés (Ruscher *et al*, 2012). L'utilisation de molécules agissant sur les récepteurs dopaminergiques et noradrénergiques combinée à une activité physique a prouvé son efficacité chez l'humain en améliorant les performances motrices (Scheidtmann *et al*, 2001). L'administration de facteurs neurotrophiques impliqués dans la croissance, la division ou la maturation des cellules neuronales, comme l'administration d'érythropoïétine améliore chez l'animal les fonctions sensori-motrices ou mnésiques en entraînant une neurogenèse au sein du gyrus denté et une diminution de l'inflammation 1 mois après l'opération (Schäbitz *et al*, 2007 ; Zhang *et al*, 2012). Une diminution de l'atrophie de l'hémisphère ipsilatéral en comparaison aux rats contrôles couplé à une angiogenèse et un remodelage axonal est également observée (Ding *et al*, 2011).

En conclusion, notre modèle d'ischémie cérébrale à long terme s'inscrit comme un modèle reproductible et pertinent pour étudier les effets à l'échelle fonctionnelle, anatomique, cellulaire et moléculaire. Ces résultats vont permettre de poursuivre les investigations, particulièrement dans l'installation de la démence au décours de l'AVC, et serviront de référence pour l'essai de traitements pharmacologiques aussi bien que pour développer une étude sur l'influence des facteurs de risque vasculaires dont le rôle délétère est de plus en plus suggéré dans la mise en place du déclin cognitif.

Annexe

HIPPOCAMPAL AND ENTORHINAL CORTEX ATROPHY AS A MECHANISM OF LONG-TERM COGNITIVE DEFICIT IN STROKE

Delattre C¹, Auger F³, Devedjian JC^{1,4}, Bordet R¹, Bastide M^{1,2}

¹Laboratoire de Pharmacologie, Université Lille2, Université Lille-Nord de France

²IUT A, Université Lille1, Université Lille-Nord de France

³ Plate-forme d'Imagerie, IMPRT

⁴ Université du Littoral et de la Côte d'Opale, Université Lille-Nord de France

*Corresponding author

Laboratoire de Pharmacologie, Faculté de Médecine, Université Lille-Nord de France, 1 place de Verdun, 59045 Lille cedex, France

Tel +33(0)3 20 44 54 49

Fax +33(0)3 20 44 68 63

Email michele.bastide@univ-lille1.fr

Running title: Long-term poststroke cognitive deficit

Abstract

It is now well-established that stroke is associated with occurrence of long-term cognitive disorder or dementia. The mechanisms of this long-term complication remained complex with different hypothesis. Among them, common mechanisms with Alzheimer-type dementia have been proposed. Our hypothesis was that stroke occurrence could influence the hippocampal and entorhinal atrophy as observed in Alzheimer disease (AD).

Male Wistar rats were subjected to transient middle cerebral artery occlusion and kept until 6 months postischemia. Cerebral lesions and atrophy were studied by magnetic resonance imaging in parallel to cognitive assessment and neurotrophic factor level.

MRI results evidenced a significant atrophy of the ipsilateral hemisphere with a decrease of hippocampus volume and cortical thickness from 1 month postischemia. Neuronal cellular surface at 6 months poststroke was significantly decreased in CA1, CA2, CA3 and CA4 areas of brain ischemic rats. BDNF mRNA expression progressively decreased through the postischemic period. Behavioral investigations revealed, at 6 months postischemia, a significant impairment of working memory and reference hippocampal-linked memory.

Our results highlighted the role of hippocampal and entorhinal cortex atrophy in the pathophysiology of post-stroke dementia or interactions between vascular and degenerative dementia suggesting a relationship between neurotrophic pathway, cellular and tissular degenerative process and cognition. Extensive time-dependent preclinical studies must be considered since mnemonic impairments could appear at distance from the stroke event. Possibly, this remote period could constitute a new time-window to interfere by pharmacological strategies or rehabilitating procedures.

Introduction

Stroke is the second cause of dementia in industrialized countries and the incidence is still increased with, in France, 130 000 new cases of stroke occurring per year. Spontaneous clinical recovery occurred but is usually incomplete. It is now well-established that stroke is associated with occurrence of long-term cognitive disorder or dementia [1,2]. The mechanisms of this long-term cognitive decline is poorly documented with different hypothesis [3,4]. Among them, an interaction with previous Alzheimer-type dementia has been proposed. Pre-clinical studies have highlighted common mechanisms linking

progressive postischemic cognitive decline and Alzheimer's disease (AD). In dementia patients brains, Magnetic Resonance Imaging (MRI) investigations have demonstrated that different brain areas related to memory functions could be injured like hippocampus and cortical tissues [5]. Our hypothesis was that stroke occurrence could induce in the chronic phase a hippocampal and entorhinal atrophy as it is observed in Alzheimer disease. In stroke patients a significant decrease of ipsilateral hippocampus volume is observed even if, at first, ischemia didn't reach hippocampus. Evidences raise that preclinical study must be extended to long term period to fit together neuropathological and behavioral abnormalities since on transient MCA occlusion model (MCAO) MRI detectable changes of ischemia-damaged brain tissue persisted for at least 1 year. The hippocampal atrophy could be related to: (i) ischemia-induced amyloid toxicity; (ii) endothelial dysfunction; (iii) impairment of neurotrophic factor expression. To test this third hypothesis we studied, on the same animals, the size of hippocampal and entorhinal cortex in a long-term stroke model in parallel to cognitive assessment and neurotrophic factor level.

Materials & methods

All procedures were performed according to the European Directive (86/609/EEC) and approved by the local ethics committee, Comité d'éthique en Experimentation Animale du Nord-Pas de Calais.

Animals

Male Wistar rats weighing 280 to 320g (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) were used in all experiments. Each time, Guidelines of the National Institutes of Health and the French Department of Agriculture have been strictly respected. The animals were randomized and housed in standard cages with continuous access to water drinking and food *ad libitum* throughout the experimental period. The colony room had a 12-h light/12-h dark cycle with lights on at 7 a.m. After operation, rats were weighted every week to follow gain weight during time. The animals were sacrificed at 1, 2, 4 or 6 months after ischemia with a lethal dose of pentobarbital (100 mg/kg, i.p.).

Middle cerebral artery occlusion (MCAO) model

Rats are anesthetized with intraperitoneal administration of chloral hydrate (300mg.kg⁻¹ i.p). A rectal probe has been inserted, and core temperature was maintained with a heating pad and lamp at 37 +/- 0.5°C. The ostium of the right middle cerebral artery (MCA) was occluded intraluminally with a method previously described [6]. After 1 h,

reperfusion was obtained by carefully removing the monofilament until its tip was blocked by the common carotid artery suture. Animals were then placed in a cage to recover from anesthesia at room temperature and were allowed food and drink. The similar surgical procedure is realized on sham animals except the introduction of the monofilament.

Behavioral tests

At each time-point, 1, 2, 4, or 6 months, some sham and ischemic-reperfused (IR) rats underwent the different behavioral tests and then were sacrificed for histopathology.

Spontaneous motor behavior

Spontaneous motor activity was measured in an actimeter (Bioseb, France). The apparatus was a 45x45x35cm transparent Plexiglas enclosure with a black floor equipped with two frames of infrared beams. It allowed horizontal motor activity (distance traveled, in centimeters) and rearing behavior (number of rears) measurements. Motor activity was recorded for 10 min and beam obstructions were counted with a computer. A central zone covering 1 of 9th of the total floor area was monitored independently of the rest of the arena and distinguished only by the computer. The floor was covered with sawdust to diminish odors cues. Measured parameters were total distance covered, distance covered in central (CZ) and peripheral (PZ) zones, time spent in CZ and PZ, rears and inactivity time [7].

Spontaneous alternation

Spontaneous alternation test was performed using a closed-circuit video camera (Ethovision, Noldus, The Netherlands). The Y-Maze was made of black wood with three arms of equal size (50cm x 15cm x 32cm) according to an angle of 120°. The Y-Maze was placed in a room without environmental cues. Each rat was placed at the end of one arm and allowed to move freely in the three arms of the maze during an 8 min session. Excrement and urine were cleaned between each rat. An arm visit was scored when all four of the rat's paws were within the arm. The sequence of the arm entries was recorded and later analyzed. An alternation response was scored when the animal entered the least recently visited arm. The percentage of spontaneous alternation was calculated as the ratio of the actual to possible alternations (defined as the total number of arm entries minus 2) multiplied by 100 [8]. For a correct measure of the qualitative aspect of this behavior, this calculation was done only with rats which made more than twenty visits.

Morris Water Maze (MWM)

The spatial reference memory was assessed using a standard Morris water maze paradigm [9]. The maze consisted of a white circular pool with 180 cm in diameter filled with water (temperature around 23°C, depth 40 cm) situated in a room with visual cues on the walls. Indirect illumination was provided by four spiral compact fluorescent lamp in each corner facing the walls. A white platform with 10 cm in diameter was submerged in the water (1 cm below the water surface) and the pool was conceptually divided into four quadrants. The platform was placed in the center of one of them and start positions for the NE goal were: NW, W, SW, S and SE (N and E were not used) [10]. The platform remained in the same quadrant throughout the task. Rats received five training days (sessions) and a probe trial in the 6th day. Each session consisted of four trials with a 15 min intertrial interval. In each session, four starting position were used and the order of the sequence was changed pseudo-randomly between days. For each trial, the rat was placed in water facing tank wall. Rats were towel-dried and returned to their home cages after each trial. During training, escape latencies were measured for each session. Once the rat found the platform, the trial was terminated, and the rat was allowed to stay on the platform for 20 seconds. Animals were hand-guided to the platform if they did not find it by 90 s and were allowed to remain on the platform for 20 s; these training intervals were given a 90 s value. 24 hours after the last training trial, animals were subjected to a probe trial for 90 s in which the platform was removed; four parameters were then recorded as an index of spatial memory retention, latency to cross over the location of the platform, the number of target crossings and the time spent in target (the quadrant in which the platform was located in training sessions) and opposite quadrants. Cued trials tested the animals' ability to see and use proximal cues. The platform remained submerged but its location was marked with a black object that protruded 10 cm above the surface of the water. The curtains were closed to minimize extramaze cues and animals were tested for one trial 1 hour after the probe trial with the start in S position and platform in SW position to avoid memory retention of the task. Animals which did not find the platform were excluded from the study. Trials were recorded by a video camera mounted above the center of the tank. Videotapes were analyzed using dedicated software (Ethovision, Noldus, Wageningen, The Netherlands).

In vivo MR Imaging and data processing

Sham and IR rats underwent MRI measurements at the different time-points 1, 2, 4, or 6 months. MRI measurements were performed using a 7 Tesla, 20 cm bore superconducting magnet (Biospec Ettlingen, Germany) interfaced to a Bruker Advance

console running Paravision 5.1. The system is equipped with actively shielded gradients capable of producing field gradients of 200 mT/m with rise times of 100 μ s.

After being anesthetized with isoflurane (4%), the rats were placed in a holder equipped with a nose cone for administering gases (50% of ambient air and 50% of oxygen) and ear bars to minimize movement during the MRI scan. Rats were monitored for changes in their respiratory rate in order to adjust the anesthetic concentration. A birdcage/surface coil pair was used for radiofrequency (RF) transmission and reception. A 3-plane scout imaging sequence was used to iteratively adjust the position of the animal's head. After completing the setup procedures, a series of MR images were acquired using a 40mm field of view (FOV). Animals were studied at 24 hours, 7 days and 1, 2, 4 and 6 months post-ischemia.

T2-weighted images: T2-weighted images were done in two dimensions [11]. T2-weighted images were measured using spin echo (SE) sequence (20 slices each of 0.85mm thickness; 256x256 matrix; TR=5000ms; TE=77ms) and (26 slices each of 0.4mm thickness; 256x256 matrix; TR=5000ms; TE=33ms) respectively in axial and coronal plan. Total imaging was 25 min per rat.

T2-weighted images analyze: DICOM images are analyzed with ITK-SNAP 1.8 freeware [12] www.itksnap.org. TIFF images were analyzed with ImageJ freeware to quantify entorhinal cortex thickness 5.30mm posterior to the bregma [13].

Tissue preparation and histopathology

Rats were deeply anesthetized with a lethal dose of pentobarbital (100 mg/kg, i.p.) and underwent transcardiac perfusion/fixation with saline followed by 4% paraformaldehyde after last MRI. Brains were removed, dehydrated, embedded in paraffin, cut in 8 μ m thick coronal sections.

Cellular density and cellular surface

After deparaffinization and hydration to 95% ethanol, slides were incubated to a solution of 0.1% Luxol Fast Blue in 95% ethanol and 0.5% acetic acid. After staining overnight at 60°C, sections were washed with 95% ethanol then in distilled water before differentiation in 0.5% aqueous lithium carbonate followed by 70% ethanol, and washed in distilled water. Sections were then incubated in 0.5% cresyl violet for 50 seconds, dehydrated through a graded serie of ethanol and coverslipped.

Analysis of cell surface and number of cells were counted on different areas located on coronal sections around 2.80 mm posterior of bregma using Leica microscope at a magnification of 1000X. Cells were counted in dentate gyrus, CA1, CA2, CA3 and CA4 of the hippocampus on both sides.

Quantitative real-time mRNA analysis

Hippocampus were dissected from brain of ischemic or SHAM animals. Total RNA was extracted from samples with Extract-all (Eurobio, Les Ulis, France) according to the kit manufacturer protocol. Total RNA was quantified by spectrophotometer at 260 nm wave length. Contaminating DNA was removed from RNA samples by a 30 min digestion at 37°C with Dnase I (Roche Applied Science, Meylan, France).

Reverse transcription

Each RNA sample (1 µg) was used for reverse transcription performed under standard conditions with superscript III reverse transcriptase (Life technologies, Cergy Pontoise, France) and random hexamer primers (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France) in a 20 µl final volume. The reaction was carried out at 42°C for 30 min and stopped with incubation at 99°C for 5 min. The RT reactions were then diluted to 100 µl in water.

Real time PCR

Quantitative PCR was performed using a LightCycler system (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. Reactions were performed in 10 µl with 1 µl cDNA, 0.5 µ mol/L primers, 4 mmol/L MgCl₂ and 1 µl of LightCycler-FastStartDNA Master SYBR Green 1 mix (Roche Applied Science). Protocol consisted in a hot start step (8 min at 95°C) followed by 50 cycles including a 10 s denaturation step (95°C), a 10 s annealing step (60°C) and a 10 s elongation step (72°C). PCR efficiencies were optimized according to Roche Applied Science's recommendations on a standard sample expressing all studied genes. To confirm amplification specificity, PCR products were subjected to a melting curve analysis. Quantification data represent the mean of two experiments. TBP (TATAbox Binding Protein) was selected among other housekeeping genes for normalization in real-time PCR analysis. The sequences for the primers used for each of the genes analyzed are:

TBP Up 5'-TGCAGTCATCATGAGAATAAGAGAG-3'

TBP Lo 5'-CCCACCATGTTCTGGATCTT-3'

BDNF Up 5'-ACGACGACGTCCCTGGCTGA-3'

BDNF Lo 5'-CACACGCTCAGCTCCCCACG-3'

Relative quantification analyses were performed by RelQuant 1.01 Software (Roche Applied Science).

Statistical analysis

All statistic analysis was conducted using the SPSS software. Data were expressed as means \pm standard error of the mean (sem). Result values were compared with a one-way ANOVA followed, when ANOVA was significant, by a post-hoc Protected Least Significant Difference (PLSD) Fisher test. A level of $P < 0.05$ (*) was considered to be statistically significant.

Results

Unilateral transient cerebral ischemia alters mnemonic capacities

General activity is evaluated in an activity cage to assess if a cerebral ischemia induced-locomotor deficit could affect the performance of the IR animals (n=56) compared to sham animals (n=61) prior to mnemonic tests. A significant (*:p<0.05) decrease of total distance covered by sham rats is observed from 1 to 6 months postischemia compared to an insignificant variation with ischemic-reperfused (IR) rats. IR rats at 1 month showed a significant (*:p<0.05) decrease of total distance compared to sham ones that could reflect a transient post-ischemic deficit (table 1). No differences of inactivity time could be observed between sham and IR rats throughout the different times but a significant progressive increase of inactivity time is observed with both groups from 2 to 6 months (#: p<0.05 vs sham 2 months; §:p<0.05 vs 2 months IR rats) that could be related to the significant (**:p<0.00 sham 1 month compared to sham 6 months;***: p<0.00 IR 1 month compared to IR 6 months) weight gain throughout the 6 months period (table 1). Maximal speed developed by sham and IR rats has been quantified and no difference observed. Nevertheless, at 6 months the maximal speed of sham rats is significantly decreased compared to 1, 2 and 4 months values but similar to those observed with IR rats at the same time point. Both sham and ischemic rats showed spontaneous locomotor activity proving their ability to move correctly in the area and to experiment mnemonic tests.

As the animals must be naïve to perform the mnemonic tests otherwise it would interfere with the performances, they did the different tests only a single time at 1, 2, 4 or 6 months. Ischemia-induced deficits in cognition and their evolution through the postischemic time were examined using spontaneous alternation and, at 6 months, Morris water maze. Spontaneous alternation required rats to remember which arms they previously entered in order to alternate successfully. Results showed that sham rats had no working memory deficit whatever the poststroke time. On the contrary, ischemic rats evidenced a progressively significant (*:p<0.05) decrease of mnemonic performances throughout the postischemia time while the slight increase observed with sham rats between 1 month and 6 months was not significant (figure 1). At 6 months a significant reduced performance was obtained with IR rats compared to sham ones.

Spatial learning and memory performances were assessed using a MWM test at 6 months reperfusion. During 5-days training both ischemic and sham animals learned to reach the hidden platform (figure 2A). A significant difference was observed at day 2 and day 3 with

sharp decline latency for sham animals versus a slow downward trend for IR animals suggesting that IR animals required more time of learning than the sham group. The probe test performed on the 6th day showed that the latency to cross over the location of the platform was significantly shorter and the numbers of crossings on platform significantly higher for sham rats than IR ones (figure 2B,C). Ischemic animals spent similar times in each quadrant while sham ones focused on target quadrant that showed a more random search pattern in IR animals compared to controls (Fig 2D). Analysis of performance in the visible platform training showed that all rats reached the platform in less than 30 s (20.00 ± 4.68 s for sham rats and 20.33 ± 3.7 s for IR rats) indicating that there is no visual impairment between groups.

Lesion quantification on T2 images

Total lesion volume evolved during time

To follow lesion evolution during postischemic time, different imaging parameters were quantified at specific time-points. MRI was a reproducible and non-invasive technique and lesion volume is correlated with histomorphometry [14,15].

At 24 hours, tissue lesion appeared as hyperintensity signal in T2 sequence. From 7 days, lesion differentiated between hyperintensity and hypointensity signals both in cortical and sub-cortical parts of the right hemisphere (figure 3A). The animals showing only subcortical lesion as well as the animals showing infarct in posterieur cerebral artery supplying region were excluded from the study (27 % of the operated animals).

Total lesion volume, gathering every kind of lesion, significantly decreased (**:p<0.01) between 24 hours (187.45 ± 17.54 mm³, n=64) and 7 days (127.03 ± 12.90 mm³, n=48) and concomitantly, edema (obtained by the difference between right and left hemisphere) significantly decreased (**:p<0.01) (69.17 ± 8.64 mm³ at 24 hours vs 6.73 ± 2.82 mm³ at 7 days) (figure 3B). Between 7 days and 4 months postischemia, total lesion volume remained similar and was significantly different from the 24 hours volume (**:p<0.01), the difference was still significant at 6 months (*: p<0.05, figure 3C).

Ipsilateral hippocampal and entorhinal atrophy in rats with unilateral MCAO

Since the medial temporal lobe structures were essential for learning tasks and memory, the volumes of right hemisphere, hippocampus and the entorhinal cortex thickness have been measured on T2 MRI images.

From 1 to 6 months, right hemisphere and right hippocampus volumes from IR rats were significantly ($^*:p<0.05$) reduced compared to sham rats whatever the reperfusion times (figure 4A,B). Concerning left hemisphere and left hippocampus no significant difference was observed between IR and sham rats (data not shown). The right entorhinal cortex thickness was very stable throughout the postischemic period in sham brains while in ischemic ones a progressive and significant thinning ($^*:p<0.05$) is observed (figure 4C).

1-hour ischemia induced damages on the right hippocampus compared to time-matched sham animals. We focused at the longer postischemic time, i.e. 6 months, where the mnemonic impairments were the most significant. Ischemia induced a substantial cell death in right hippocampus revealed by luxol fast blue/cresyl violet staining (figure 5A). Cell density was not significantly reduced in the different regions of IR hippocampus compared to sham ones even if there is a trend for lower density (figure 5A). On the other hand, cell surfaces quantification in CA1, CA2, CA3 and CA4 regions on sham and IR animals revealed a significant ($^*:p<0.05$) cellular shrinkage at 6 months postischemia (figure 5B). In parallel, BDNF mRNA measured in both entorhinal cortex (figure 5C) and hippocampus (figure 5D) of IR rats, showed a trend to a progressive decrease of BDNF mRNA expression on ipsilateral side compared to contralateral one through the postischemic period even if significant difference could not be reached.

Discussion

The present findings have sought to associate atrophy evaluation by MRI imaging with cognitive assessment at regular time-points during 6 months poststroke period. The main results showed: (i) 7 days after stroke, the infarct lesion size was stabilized and the volume lesion remained the same until 6 months; (ii) atrophy appeared since 1 month postischemic at distance of the ischemic lesion in memory-related areas, i.e. the hippocampus and the entorhinal cortex; (iii) cellular alterations in hippocampal neuronal population; (iv) a trend to a reduced BDNF mRNA expression in ipsilateral hippocampus and entorhinal cortex compared to contralateral ones; (v) a spatial and working memories impairment at 6 months postischemic period.

T2-imaging allowed to differentiate the ischemic tissue and to follow the same animals from the day of ischemia until a postischemic long-term period. MCAO induced infarct lesion in cortical and sub-cortical regions accompanied by an edema that resolves in 7 days [6,16]. From 7 days to 6 months, lesion volumes illustrated as hyperintensive regions on MRI T2-maps leveled off. Karki et al (2010) in a one-year postischemic follow-up of Wistar rats have also observed a significant decrease from 1 to 7 days and no significant modifications from 1 to 12 months. The lesion volume measured at 7 days was predictive of the lesion at 6 months post ischemic as observed in other pathologies like traumatic brain [18].

Atrophy of both ipsilateral hippocampus and entorhinal cortex developed from 1 month after ischemia/reperfusion and maintained until 6 months while MRI maps did not show any ischemic lesions in these regions supplied by posterior cerebral artery. These modifications were currently described in the course of Alzheimer disease in both hemispheres by structural MRI imaging [19]. Whole brain and hippocampal atrophy rates were sensitive markers of neurodegeneration progression in AD and could be used as surrogates outcomes in clinical trials of disease-modifying drugs. In stroke patients or rodent MCAO models, an unilateral atrophy is observed in the ipsilateral side of ischemia/reperfusion [20]. Here we observed a 10% atrophy of hippocampus and 19% of entorhinal cortex in IR rats present from 1 to 6 months postischemia. CA1 region was the more sensitive area to ischemia as well as in Alzheimer's injury but the more the postischemia time was extended, the more the neuronal changes propagated to other hippocampal regions and worsened the mnemonic impairment [21]. Gemmell et al (2012) with a

specific volumetric method have evidenced a reduced neuronal volume in CA1 and CA2 subfields on patients with poststroke dementia, vascular dementia, mixed dementia or Alzheimer dementia while there are no modifications in stroke patients without dementia. In our model, at 6 months, a significant atrophy was observed in CA1, CA2, CA3 and CA4 regions with modifications of cellular organization. Instead of cellular volume, we measured here the neuronal soma surface as criteria to evidence shrinkage of cells. There was a significant decrease of soma surface in CA1, CA2, CA3 and CA4 regions that could participate to hippocampus atrophy and be related to a loss or reduced complexity of dendritic arborization and/or axons. Moreover, entorhinal cortex thickness was significantly thinned since 1 to 6 months postischemia. Cortical thinning has been already described in different stroke-induced models one month after stroke as a consequence of infarct cavity formation, neuroinflammatory responses, apoptosis as well as neuropile loss [22]. These mechanisms underlying the neuronal morphometry changes could contribute to the disruption of trisynaptic circuitry consecutively to remoting ischemic lesions and to cognitive impairment observed in poststroke rats [3,23]. As the coordinated activity of the hippocampal trisynaptic circuit neurons was essential for the spatial orientation of the animals, its disorganization could explain that the behavioral performance in the MWM was impaired [24].

Infarct size has been for a long time the only end-point collected in experimental stroke studies but it was an insufficient outcome surrogate. Functional outcome was essential to assess cerebral ischemia consequences and different cognitive tests have been realized at the MRI time-points to assess the neurobehavioral status of the animals. Spontaneous alternation used to detect impairment of spatial working memory on ischemic rats reflects the innate tendency of the animals to memorize the arms they have visited to alternate between the three arms. At 6 months postischemia, rats displayed a deficit in alternation task indicating a spatial working memory failure. This result suggested a disturbance of hippocampus functioning confirmed by the use of Morris watermaze which was clearly recognized as a robust and reliable test strongly correlated to hippocampal functions [10,25]. We showed spatial memory impairments at 6 months postischemia in both learning and restitution steps. Ischemic rats were able to learn the location of the platform at the end of the 5 days training but need significantly more time. Deficit was confirmed on the day test since they showed longer latency time to reach the platform, spent lesser time and made fewer crossings in target quadrant compared to sham rats. Very few experiences have been conducted at long term and mainly with global ischemia model but they revealed some dysfunctions in reference memory compared with sham rats with a deficit in learning step or

in the probe trial test [26,27,28]. At 18 months postischemia, this impairment tended to disappear with no difference evidenced between sham and ischemic rats indicating that memory impairments appeared also in sham rats due to normal aging

The significant atrophy of both hippocampus and entorhinal cortex evidenced by MRI investigations from 1 to 6 months could be an explanation of memory impairment since both structures were involved in the acquisition and the retention of the MWM task. At the cellular level, histological staining evidenced no significant changes in cellular density but rather a cellular shrinkage in hippocampal CA1, CA2, CA3 and CA4 layers but not in the ischemia-resistant dentate gyrus. Mnesic deficit arose at 6 months even if hippocampal and entorhinal cortex atrophy was already present at 1 month postischemia suggesting that atrophy phenomenon was an early biomarker of future mnesic dysfunction. In global ischemia model, rats demonstrated normal performance with spontaneous alternance in accordance to the fact that spontaneous alternation deficits were not reliably observed after selective CA1 damage but needed more widespread damage [29]. Differential pathological mechanisms could contribute to the cognitive decline as a result of primary ischemic brain injury [21,22]. BDNF played a crucial role in cerebral plasticity and reorganization in terms of synaptogenesis, neurogenesis and activity-dependent plasticity. It has been shown that administering BDNF in the acute postischemic period reduces cell death and infarct volume and as a delayed treatment facilitated motor recovery [30]. The trend to a reduction of BDNF mRNA in hippocampus described here could participate to hippocampus and entorhinal cortex atrophy by preventing neurogenesis and plasticity in these memory-related regions.

In summary, the present study brought together important of results on the long-term cognitive abilities after a stroke obtained by different technical approaches. MRI investigations evidenced anatomical changes like atrophy of hippocampus and entorhinal cortex arising as ischemic aftermath since one month following the ischemia event. These tissue alterations, at least partly due to a reduced cellular surface and reduced BDNF mRNA expression, could participate to the cognitive decline observed in these animals and all together reproduce the clinical symptoms observed in human patients after a stroke event. This long-term preclinical model could be predictive of the onset and development of poststroke dementia since similar atrophy was described in the Alzheimer disease. Further investigations were necessary to confirm the involvement of neurotrophins deficit at long-term postischemic period.

Acknowledgments: This work was supported by Regional Council of Nord-Pas de Calais and CHRU Lille (C.D.).

References

1. Henon H, Pasquier ., Leys, D. (2006) Poststroke dementia. *Cerebrovasc Dis.* 22:61-70.
2. Pendlebury ST, Rothwell PM. (2009). Prevalence, incidence, and factors associated with pre-stroke and post-stroke dementia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurology* 8:1006-1018.
3. Gemmell E, Bosomworth ., Alla, L, Hall R, Khundakar A, et al. (2012) Hippocampal neuronal atrophy and cognitive function in delayed poststroke and aging-related dementias. *Stroke* 43:808-14.
4. Pluta R, Jablonski M, Czuczwar SJ. (2012) Postischemic dementia with Alzheimer phenotype: selectively vulnerable versus resistant areas of the brain and neurodegeneration versus β -amyloid peptide. *Folia Neuropathol* 50:101-109.
5. Sabuncu MR, Desikan RS, Sepulcre J, Yeo BT, Liu H, et al. (2011) The dynamics of cortical and hippocampal atrophy in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 68:1040-8.
6. Plaisier F, Bastide M, Ouk T, Petrault O, Laprais M. et al. (2008) Stobadine-induced hastening of sensorimotor recovery after focal ischemia/reperfusion is associated with cerebrovascular protection. *Brain Res* 1208:240-9.
7. Marche K, Danel T, Bordet R (2011) Fetal alcohol-induced hyperactivity is reversed by treatment with the PPARalpha agonist fenofibrate in a rat model. *Psychopharmacology* 214(1): 285-296.
8. Hidaka N, Suemaru K, Li B, Araki H (2008) Effects of repeated electroconvulsive seizures on spontaneous alternation behavior and locomotor activity in rats. *Biol Pharm Bull* 31(10): 1928-1932.
9. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297(5868): 681-683.

10. Morris R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60.
11. Hennig J, Nauerth A, Friedburg H. (1986). RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR. *Magn Reson Med* 3:823-33.
12. Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S et al. (2006). User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage* 31:1116-28.
13. Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int*11:36-42.
14. Jiang Q, Chopp M, Zhang ZG, Knight RA, Jacobs M, et al. (1997) The temporal evolution of MRI tissue signatures after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *J Neurol Sci* 145:15-23.
15. Kloss CU, Thomassen N, Fesl G, Martens KH, Yousri TA, et al. (2002) Tissue-saving infarct volumetry using histochemistry validated by MRI in rat focal ischemia. *Neurol Res* 24:713-8.
16. Virley D, Beech JS, Smart SC, Williams SC, Hodges H, et al. (2000) A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behavior. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:563-82.
17. Karki K, Knight RA, Shen LH, Kapke A, Lu M, et al (2010) Chronic brain tissue remodeling after stroke in rat: a 1-year multiparametric magnetic resonance imaging study. *Brain Res* 1360:168-76.
18. Immonen RJ, Kharatishvili I, Grohn H, Pitkanen A, Grohn OH (2009) Quantitative MRI predicts long-term structural and functional outcome after experimental traumatic brain injury. *Neuroimage*45:1-9.
19. Frisoni GB, Fox NC, Jack CRJr, Scheltens P, Thompson PM (2010). The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 6:67-77.

20. Xie M, Yi C, Luo X, Xu S, Yu Z, et al. (2011) Glial gap junctional communication involvement in hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol* 70:121-32.
21. Pluta R, Ulamek M, Jablonski M (2009) Alzheimer's mechanisms in ischemic brain degeneration. *Anat Rec* 292:1863-81.
22. Karl JM, Alaverdashvili M, Cross AR, Whishaw IQ (2010). Thinning, movement, and volume loss of residual cortical tissue occurs after stroke in the adult rat as identified by histological and magnetic resonance imaging analysis. *Neuroscience* 170:123-37.
23. Freeman SH, Kandel R, Cruz L, Rozkalne A, Newell K, et al. (2008). Preservation of neuronal number despite age-related cortical brain atrophy in elderly subjects without Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:1205-12.
24. Gonzalez-Burgos I, Velazquez-Zamora DA, Beas-Zarate C (2009) Damage and plasticity in adult rat hippocampal trisynaptic circuit neurons after neonatal exposure to glutamate excitotoxicity. *Int J Dev Neurosci* 27:741-5.
25. De Bundel D, Schallier A, Loyens E, Fernando R, Miyashita H, et al. (2011) Loss of system x(c)- does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *J. Neurosci* 31:5792-803.
26. Kiryk A, Pluta R, Figiel I, Mikosz M, Ulamek M, et al (2011) Transient brain ischemia due to cardiac arrest causes irreversible long-lasting cognitive injury. *Behav Brain Res* 219:1-7.
27. Letechipia-Vallejo G, Lopez-Loeza E, Espinoza-Gonzalez V, Gonzalez-Burgos I, Olivera-Cortes ME et al (2007). Long-term morphological and functional evaluation of the neuroprotective effects of post-ischemic treatment with melatonin in rats. *J Pineal Res.* 42,138-46.

28. Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, et al. (2000) Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods*. 104,99-109.
29. De Butte-Smith M, Gulinello M, Zukin RS, Etgen AM (2009) Chronic estradiol treatment increases CA1 cell survival but does not improve visual or spatial recognition memory after global ischemia in middle-aged female rats. *Horm Behav* 55(3): 442-453.
30. Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn C, Schwab S, Sommer C, et al. (2007) Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 38:2165-172.

	1 month		2 months		4 months		6 months	
	sham	IR	sham	IR	sham	IR	sham	IR
Total distance (cm)	4081±213 (19)	3279±247* (13)	3559±187 (17)	3479±252 (15)	2812±140 (9)	3036±247 (13)	2290±140 (16)	2900±241* (15)
Inactivity Time (%)	34.07±3.01 (19)	40.32±3.82 (13)	30.56±2.67 (17)	27.54±2.01 (15)	46.21±4.11 (9)	42.14±3.86 (13)	56.07±2.31 (16)	48.68±2.66 (15)
Max speed (cm/s)	31.66±0.75 (19)	29.44±0.73 (13)	30.27±1.18 (17)	31.05±1.16 (15)	31.59±2 (9)	28.55±0.74 (13)	26.23±0.53 (16)	28.69±0.68 (15)
Weight (g)	420 ±6 (61)	377±9 (56)	508±5 (50)	471±8 (44)	598±14 (27)	552±15 (24)	622±19*** (18)	603±24*** (15)

Table 1: Locomotor activity parameters of sham and IR rats measured at the different postischemic times: total distance covered in cm (*:p<0.05 vs sham rats); inactivity time expressed as a percentage of the total time spent in the arena; maximum speed in cm/s; follow-up of rats weight (g) (***: p<0.00 vs 1 month)

Figure 1

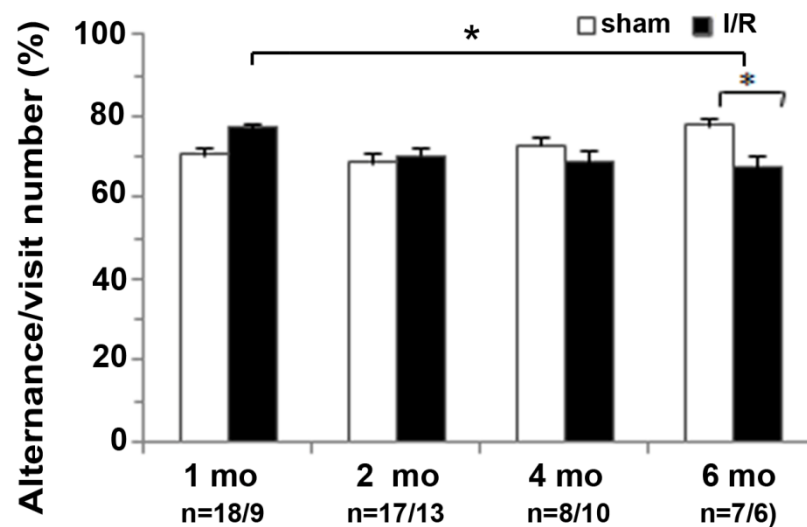


Figure 1: Spontaneous alternation is affected at long-time reperfusion by unilateral MCAO. Sham/I/R: 1m n=18/9, 2m n=17/13, 4m n=8/10, 6m n=7/6) Data are reported as percentage score (mean \pm sem). * $p < 0.05$ and *** $p < 0.00$ vs sham

Figure 2

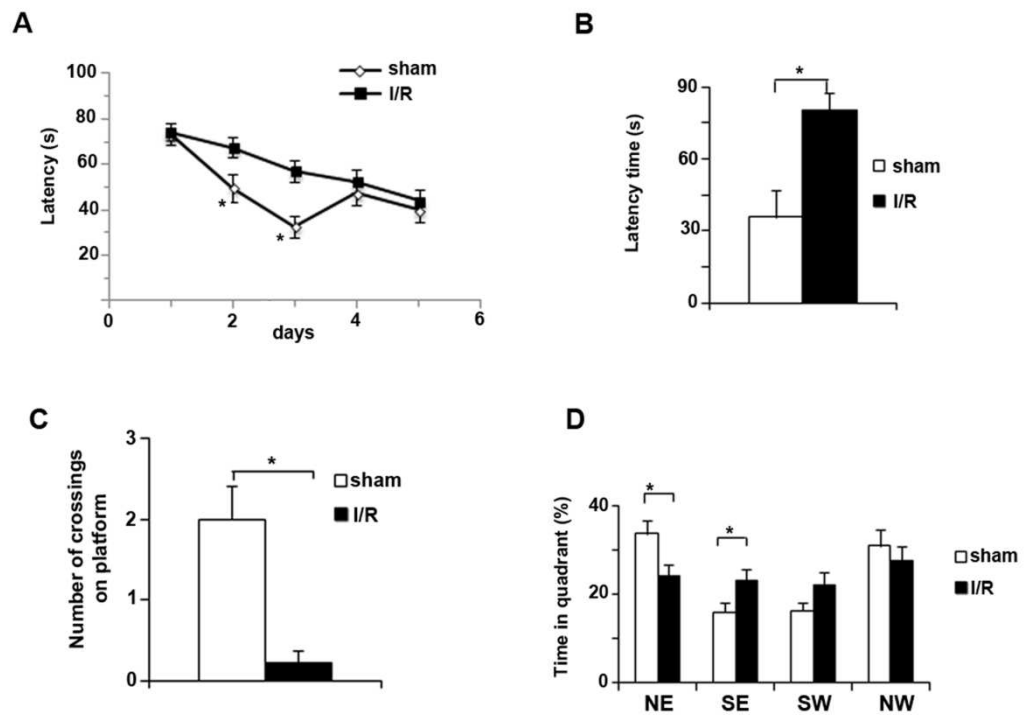


Figure 2: Effect of 6 months ischemia-reperfusion in spatial learning and memory for sham (n=8) and IR (n=11) measured by the Morris water maze. **(A)** Latency to reach the hidden platform during the 5-days learning trial **(B)** Latency to reach the platform region on the day test **(C)** Number of crossings of IR and sham animals through the platform region **(D)** Time spent by sham and IR animals in the different quadrants. Values are the mean \pm sem. * $p < 0.05$ versus sham-operated group.

Figure 3

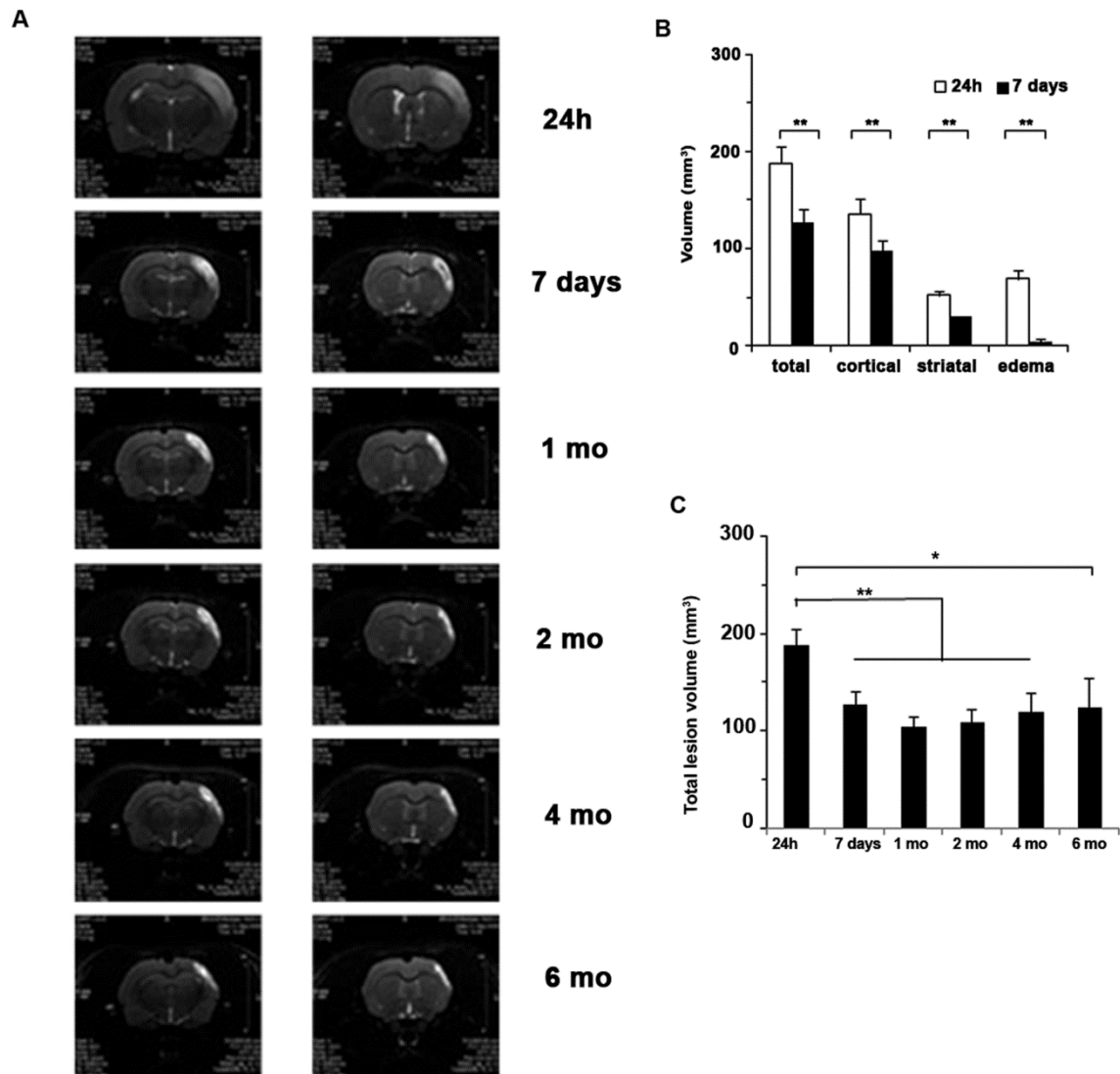


Figure 3: Evolution of brain damage volume measured on T2-MRI images at 24h, 7 days, 1, 2, 4, 6 months. **(A)** Representative T2-weighted images located at 2.80 mm (left column) and 0.40 mm (right column) posterior to the bregma. Ischemic regions are indicated by hypertensive and hypotensive areas; **(B)** Evolution of brain infarcts and edema volumes after MCAO at 24h (n=58) and 7 days (n=58) measured on T2-images **(C)** Evolution of brain damage volumes measured on T2-images. 24h n=58; 7days n=58; 1 month n=56; 2 months n=43; 4 months n=29; 6 months n=15). Values are mean \pm sem. *p<0.05 vs 24h

Figure 4

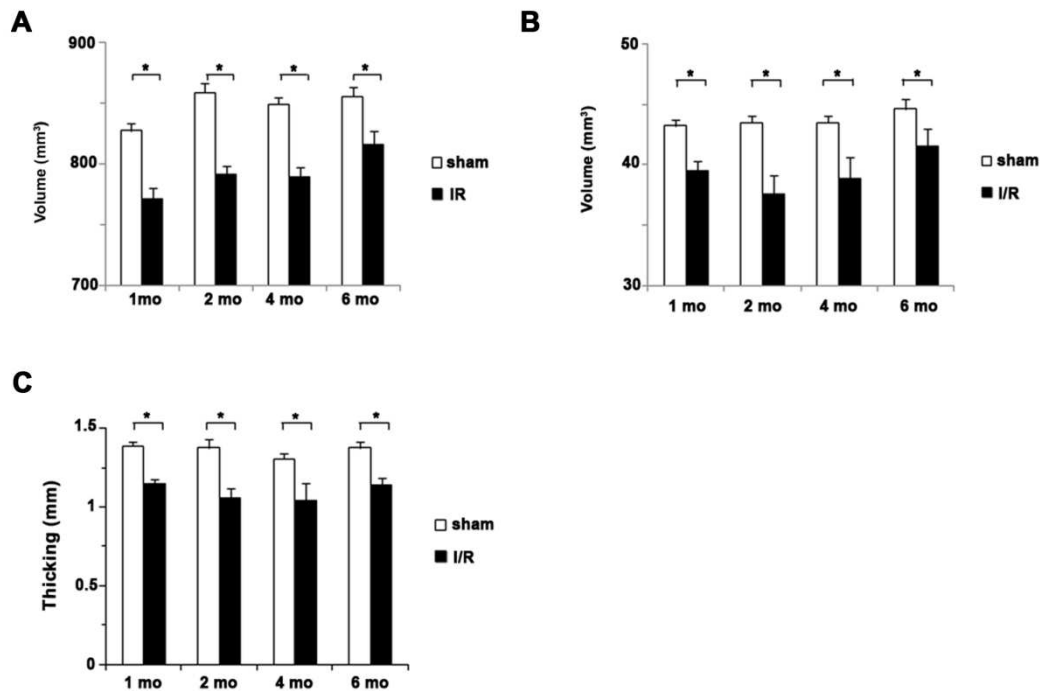


Figure 4: Summary histograms of right hemisphere and right hippocampus volumes and cortical thickness. **(A)** Right hemisphere volume. Sham/IR: 1m n=12/51, 2m n=16/41, 4m n=11/28, 6m n=16/14) **(B)** Right hippocampus volume Sham/IR: 1m n=12/51, 2m n=16/41, 4m n=11/28, 6m n=16/14) **(C)** Right entorhinal cortex thickness, Sham/IR: 1m n=7/36, 2m n=7/27, 4m n=7/18, 6m n=7/7) calculated in sham and IR rats at different times of reperfusion. Values are the mean \pm sem. * $p < 0.05$ vs sham animals.

Figure 5

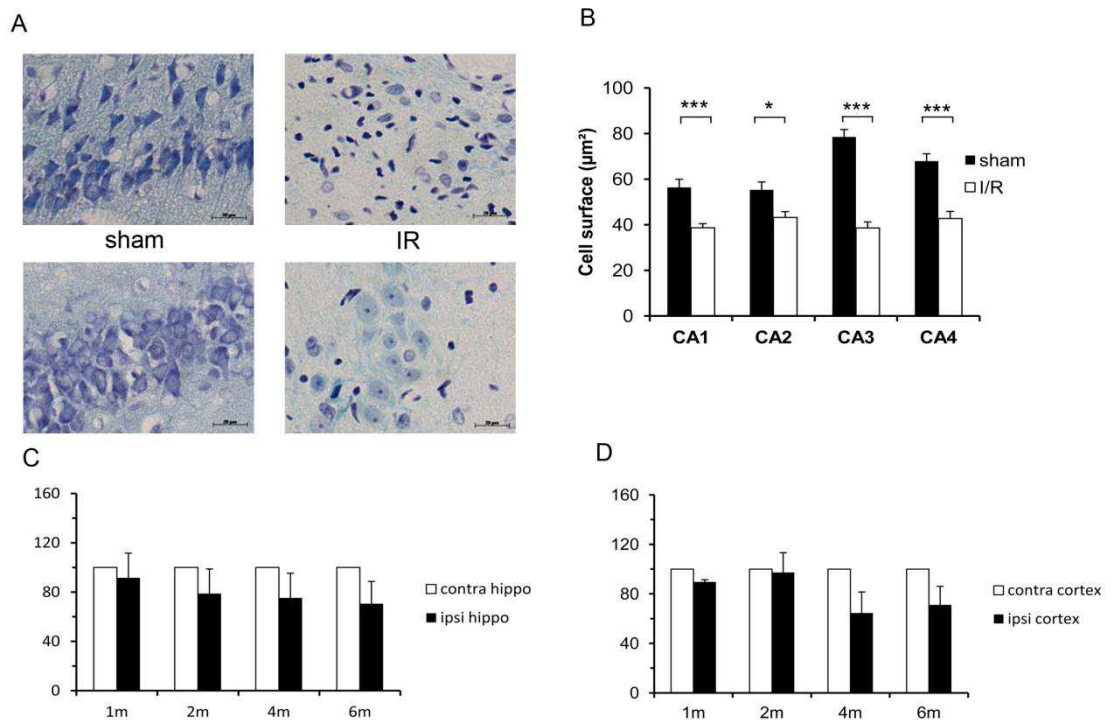


Figure 5: Histopathological changes in right hippocampus and entorhinal cortex at 6 months postischemia. **(A)** Representative microphotographs of Luxol fast Blue/Cresyl violet staining of CA1 and CA2 regions of right hippocampus of sham (left column) and IR (right column) animals. **(B)** Cell surface quantified in CA1, CA2, CA3 and CA4 regions of right hippocampus in sham and IR rats at 6 months postischemia. (4 sham rats n=60 cells; 4 IR rats n=60 cells). Values are the mean \pm sem. *** $p < 0.00$ vs sham animals; * $p < 0.05$ vs sham animals. **(C,D)** Level of BDNF transcript expression relative to the standard gene TBP determined by real time PCR on cDNA derived from hippocampus **(C)** and from entorhinal cortex **(D)** of IR rats (n=4). Ipsilateral values are normalized to contralateral ones. Mean values \pm sem.

Références bibliographiques

- Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11:36-42.
- Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, 3rd (1993) 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* 24:35-41.
- Adams HP, Jr., Davis PH, Leira EC, Chang KC, Bendixen BH, Clarke WR, Woolson RF, Hansen MD (1999) Baseline NIH Stroke Scale score strongly predicts outcome after stroke: A report of the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST). *Neurology* 53:126-131.
- Ahmad M, Graham SH (2010) Inflammation After Stroke: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Transl Stroke Res* 1:74-84.
- Allegrini PR, Wiessner C (2003) Three-dimensional MRI of cerebral projections in rat brain in vivo after intracortical injection of MnCl₂. *NMR Biomed* 16:252-256.
- Altieri M, Di Piero V, Pasquini M, Gasparini M, Vanacore N, Vicenzini E, Lenzi GL (2004) Delayed poststroke dementia: a 4-year follow-up study. *Neurology* 62:2193-2197.
- Amaral DG, Scharfman HE, Lavenex P (2007) The dentate gyrus: fundamental neuroanatomical organization (dentate gyrus for dummies). *Prog Brain Res* 163:3-22.
- Badan I, Dinca I, Buchhold B, Suofu Y, Walker L, Gratz M, Platt D, Kessler CH, Popa-Wagner A (2004) Accelerated accumulation of N- and C-terminal beta APP fragments and delayed recovery of microtubule-associated protein 1B expression following stroke in aged rats. *Eur J Neurosci* 19:2270-2280.
- Ballard C, Stephens S, Kenny R, Kalaria R, Tovee M, O'Brien J (2003) Profile of neuropsychological deficits in older stroke survivors without dementia. *Dement Geriatr Cogn Disord* 16:52-56.
- Barber PA, Demchuk AM, Zhang J, Buchan AM (2000) Validity and reliability of a quantitative computed tomography score in predicting outcome of hyperacute stroke before thrombolytic therapy. ASPECTS Study Group. Alberta Stroke Programme Early CT Score. *Lancet* 355:1670-1674.
- Barber PA, Darby DG, Desmond PM, Gerraty RP, Yang Q, Li T, Jolley D, Donnan GA, Tress BM, Davis SM (1999) Identification of major ischemic change. Diffusion-weighted imaging versus computed tomography. *Stroke* 30:2059-2065.
- Barker DJ, Lackland DT (2003) Prenatal influences on stroke mortality in England and Wales. *Stroke* 34:1598-1602.
- Bartzokis G, Tishler TA, Lu PH, Villablanca P, Altshuler LL, Carter M, Huang D, Edwards N, Mintz J (2007) Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration. *Neurobiol Aging* 28:414-423.
- Bastide M, Gele P, Petruault O, Pu Q, Caliez A, Robin E, Deplanque D, Duriez P, Bordet R (2003) Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide in parallel to brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:399-405.

- Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271:C1424-1437.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986) Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17:472-476.
- Bejot Y, Mossiat C, Giroud M, Prigent-Tessier A, Marie C (2011) Circulating and brain BDNF levels in stroke rats. Relevance to clinical studies. *PLoS One* 6:e29405.
- Belayev L, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD (1996) Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 739:88-96.
- Bonnin P, Leger PL, Deroide N, Fau S, Baud O, Pocard M, Charriaut-Marlangue C, Renolleau S (2011) Impact of intracranial blood-flow redistribution on stroke size during ischemia-reperfusion in 7-day-old rats. *J Neurosci Methods* 198:103-109.
- Bouet V, Freret T, Toutain J, Divoux D, Boulouard M, Schumann-Bard P (2007) Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp Neurol* 203:555-567.
- Bouet V, Freret T, Ankri S, Bezault M, Renolleau S, Boulouard M, Jacotot E, Chauvier D, Schumann-Bard P (2010) Predicting sensorimotor and memory deficits after neonatal ischemic stroke with reperfusion in the rat. *Behav Brain Res* 212:56-63.
- Brillault J, Berezowski V, Cecchelli R, Dehouck MP (2002) Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J Neurochem* 83:807-817.
- Brillault J, Lam TI, Rutkowsky JM, Foroutan S, O'Donnell ME (2008) Hypoxia effects on cell volume and ion uptake of cerebral microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 294:C88-96.
- Brott T, Adams HP, Jr., Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, Spilker J, Holleran R, Eberle R, Hertzberg V, et al. (1989) Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* 20:864-870.
- Brouns R, De Deyn PP (2009) The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 111:483-495.
- Brouns R, Sheorajpanday R, Wauters A, De Surgeloose D, Marien P, De Deyn PP (2008) Evaluation of lactate as a marker of metabolic stress and cause of secondary damage in acute ischemic stroke or TIA. *Clin Chim Acta* 397:27-31.
- Brown CE, Aminoltejadi K, Erb H, Winship IR, Murphy TH (2009) In vivo voltage-sensitive dye imaging in adult mice reveals that somatosensory maps lost to stroke are replaced over weeks by new structural and functional circuits with prolonged modes of activation within both the peri-infarct zone and distant sites. *J Neurosci* 29:1719-1734.
- Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO (1996) Stroke incidence, prevalence, and survival: secular trends in Rochester, Minnesota, through 1989. *Stroke* 27:373-380.

- Buchan AM, Xue D, Slivka A (1992) A new model of temporary focal neocortical ischemia in the rat. *Stroke* 23:273-279.
- Burchfiel CM, Curb JD, Rodriguez BL, Abbott RD, Chiu D, Yano K (1994) Glucose intolerance and 22-year stroke incidence. The Honolulu Heart Program. *Stroke* 25:951-957.
- Busch E, Kruger K, Hossmann KA (1997) Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res* 778:16-24.
- Butefisch CM, Wessling M, Netz J, Seitz RJ, Homberg V (2008) Relationship between interhemispheric inhibition and motor cortex excitability in subacute stroke patients. *Neurorehabil Neural Repair* 22:4-21.
- Carmichael ST (2003) Plasticity of cortical projections after stroke. *Neuroscientist* 9:64-75.
- Carmichael ST (2005) Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2:396-409.
- Carmichael ST, Wei L, Rovainen CM, Woolsey TA (2001) New patterns of intracortical projections after focal cortical stroke. *Neurobiol Dis* 8:910-922.
- Carmichael ST, Archibeque I, Luke L, Nolan T, Momiy J, Li S (2005) Growth-associated gene expression after stroke: evidence for a growth-promoting region in peri-infarct cortex. *Exp Neurol* 193:291-311.
- Cassidy TP, Lewis S, Gray CS (1998) Recovery from visuospatial neglect in stroke patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64:555-557.
- Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck MP, Fenart L (2007) Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 6:650-661.
- Choi DW (1995) Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18:58-60.
- Choi DW (1996) Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 6:667-672.
- Chouinard PA, Leonard G, Paus T (2006) Changes in effective connectivity of the primary motor cortex in stroke patients after rehabilitative therapy. *Exp Neurol* 201:375-387.
- Cipolla MJ, Crete R, Vitullo L, Rix RD (2004) Transcellular transport as a mechanism of blood-brain barrier disruption during stroke. *Front Biosci* 9:777-785.
- Cordoliani-Mackowiak MA, Henon H, Pruvo JP, Pasquier F, Leys D (2003) Poststroke dementia: influence of hippocampal atrophy. *Arch Neurol* 60:585-590.
- Crack PJ, Taylor JM (2005) Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radic Biol Med* 38:1433-1444.
- Craig LA, Hong NS, McDonald RJ (2011) Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 35:1397-1409.
- Cramer SC (2008) Repairing the human brain after stroke: I. Mechanisms of spontaneous recovery. *Ann Neurol* 63:272-287.

- Cramer SC, Crafton KR (2006) Somatotopy and movement representation sites following cortical stroke. *Exp Brain Res* 168:25-32.
- Crumrine RC, Marder VJ, Taylor GM, Lamanna JC, Tsipis CP, Scuderi P, Petteway SR, Jr., Arora V (2011) Intra-arterial administration of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) causes more intracranial bleeding than does intravenous rt-PA in a transient rat middle cerebral artery occlusion model. *Exp Transl Stroke Med* 3:10.
- Dahlqvist P, Ronnback A, Bergstrom SA, Soderstrom I, Olsson T (2004) Environmental enrichment reverses learning impairment in the Morris water maze after focal cerebral ischemia in rats. *Eur J Neurosci* 19:2288-2298.
- Dancause N, Barbay S, Frost SB, Plautz EJ, Chen D, Zoubina EV, Stowe AM, Nudo RJ (2005) Extensive cortical rewiring after brain injury. *J Neurosci* 25:10167-10179.
- Delcour M, Russier M, Amin M, Baud O, Paban V, Barbe MF, Coq JO (2012) Impact of prenatal ischemia on behavior, cognitive abilities and neuroanatomy in adult rats with white matter damage. *Behav Brain Res* 232:233-244.
- den Heijer T, Geerlings MI, Hoebeek FE, Hofman A, Koudstaal PJ, Breteler MM (2006) Use of hippocampal and amygdalar volumes on magnetic resonance imaging to predict dementia in cognitively intact elderly people. *Arch Gen Psychiatry* 63:57-62.
- Desmond PM, Lovell AC, Rawlinson AA, Parsons MW, Barber PA, Yang Q, Li T, Darby DG, Gerraty RP, Davis SM, Tress BM (2001) The value of apparent diffusion coefficient maps in early cerebral ischemia. *AJNR Am J Neuroradiol* 22:1260-1267.
- Detke MJ, Lucki I (1996) Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav Brain Res* 73:43-46.
- Dhamoon MS, Moon YP, Paik MC, Sacco RL, Elkind MS (2012) Trajectory of functional decline before and after ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. *Stroke* 43:2180-2184.
- Diener HC, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Shuaib A, Ashwood T, Wasiewski W, Alderfer V, Hardemark HG, Rodichok L (2008) NXY-059 for the treatment of acute stroke: pooled analysis of the SAINT I and II Trials. *Stroke* 39:1751-1758.
- Dietrich WD, Busto R, Watson BD, Scheinberg P, Ginsberg MD (1987) Photochemically induced cerebral infarction. II. Edema and blood-brain barrier disruption. *Acta Neuropathol* 72:326-334.
- Dijkhuizen RM, Singhal AB, Mandeville JB, Wu O, Halpern EF, Finklestein SP, Rosen BR, Lo EH (2003) Correlation between brain reorganization, ischemic damage, and neurologic status after transient focal cerebral ischemia in rats: a functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci* 23:510-517.
- Ding G, Jiang Q, Li L, Zhang L, Wang Y, Zhang ZG, Lu M, Panda S, Li Q, Ewing JR, Chopp M (2010) Cerebral tissue repair and atrophy after embolic stroke in rat: a magnetic resonance imaging study of erythropoietin therapy. *J Neurosci Res* 88:3206-3214.
- Ding H, Yan CZ, Shi H, Zhao YS, Chang SY, Yu P, Wu WS, Zhao CY, Chang YZ, Duan XL (2011) Hecpidin is involved in iron regulation in the ischemic brain. *PLoS One* 6:e25324.

- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397.
- Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55:310-318.
- Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW (1995) Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15:6377-6388.
- Duncan PW, Goldstein LB, Horner RD, Landsman PB, Samsa GP, Matchar DB (1994) Similar motor recovery of upper and lower extremities after stroke. *Stroke* 25:1181-1188.
- Durukan A, Tatlisumak T (2007) Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 87:179-197.
- Edvinsson L, Krause DN (2002) *Cerebral Blood Flow and Metabolism*, Second Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Feigin VL, Barker-Collo S, Parag V, Senior H, Lawes CM, Ratnasabapathy Y, Glen E (2010) Auckland Stroke Outcomes Study. Part 1: Gender, stroke types, ethnicity, and functional outcomes 5 years poststroke. *Neurology* 75:1597-1607.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189-198.
- Forster A, Gass A, Kern R, Wolf ME, Ottomeyer C, Zohsel K, Hennerici M, Szabo K (2009) Gender differences in acute ischemic stroke: etiology, stroke patterns and response to thrombolysis. *Stroke* 40:2428-2432.
- Freret T, Schumann-Bard P, Boulouard M, Bouet V (2011) On the importance of long-term functional assessment after stroke to improve translation from bench to bedside. *Exp Transl Stroke Med* 3:6.
- Freret T, Chazalviel L, Roussel S, Bernaudin M, Schumann-Bard P, Boulouard M (2006) Long-term functional outcome following transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation between brain damage and behavioral impairment. *Behav Neurosci* 120:1285-1298.
- Frerichs KU, Deckert M, Kempfski O, Schurer L, Einhaupl K, Baethmann A (1994) Cerebral sinus and venous thrombosis in rats induces long-term deficits in brain function and morphology--evidence for a cytotoxic genesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:289-300.
- Furukawa K, Fu W, Li Y, Witke W, Kwiatkowski DJ, Mattson MP (1997) The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *J Neurosci* 17:8178-8186.
- Gautier S, Ouk T, Petrault O, Caron J, Bordet R (2009) Neutrophils contribute to intracerebral haemorrhages after treatment with recombinant tissue plasminogen activator following cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol* 156:673-679.

- Gavins F, Yilmaz G, Granger DN (2007) The evolving paradigm for blood cell-endothelial cell interactions in the cerebral microcirculation. *Microcirculation* 14:667-681.
- Gemmell E, Bosomworth H, Allan L, Hall R, Khundakar A, Oakley AE, Deramecourt V, Polvikoski TM, O'Brien JT, Kalara RN (2012) Hippocampal neuronal atrophy and cognitive function in delayed poststroke and aging-related dementias. *Stroke* 43:808-814.
- Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS (2005) Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H558-568.
- Gillani RL, Tsai SY, Wallace DG, O'Brien TE, Arhebamen E, Tole M, Schwab ME, Kartje GL (2010) Cognitive recovery in the aged rat after stroke and anti-Nogo-A immunotherapy. *Behav Brain Res* 208:415-424.
- Gincel D, Zaid H, Shoshan-Barmatz V (2001) Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem J* 358:147-155.
- Goldstein LB, Adams R, Alberts MJ, Appel LJ, Brass LM, Bushnell CD, Culebras A, Degraba TJ, Gorelick PB, Guyton JR, Hart RG, Howard G, Kelly-Hayes M, Nixon JV, Sacco RL (2006) Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Stroke* 37:1583-1633.
- Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- Gunter TE, Yule DI, Gunter KK, Eliseev RA, Salter JD (2004) Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* 567:96-102.
- Gupta A, Gupta V (2010) Metabolic syndrome: what are the risks for humans? *Biosci Trends* 4:204-212.
- Haacke EM, Xu Y, Cheng YC, Reichenbach JR (2004) Susceptibility weighted imaging (SWI). *Magn Reson Med* 52:612-618.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359:1317-1329.
- Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ (1995) Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 26:2120-2126.
- Hennig J, Nauerth A, Friedburg H (1986) RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR. *Magn Reson Med* 3:823-833.
- Henon H, Durieu I, Guerouaou D, Lebert F, Pasquier F, Leys D (2001) Poststroke dementia: incidence and relationship to prestroke cognitive decline. *Neurology* 57:1216-1222.

- Hewlett KA, Corbett D (2006) Delayed minocycline treatment reduces long-term functional deficits and histological injury in a rodent model of focal ischemia. *Neuroscience* 141:27-33.
- Hidaka N, Suemaru K, Li B, Araki H (2008) Effects of repeated electroconvulsive seizures on spontaneous alternation behavior and locomotor activity in rats. *Biol Pharm Bull* 31:1928-1932.
- Hjort N, Christensen S, Solling C, Ashkanian M, Wu O, Rohl L, Gyldensted C, Andersen G, Ostergaard L (2005) Ischemic injury detected by diffusion imaging 11 minutes after stroke. *Ann Neurol* 58:462-465.
- Horenstein RB, Smith DE, Mosca L (2002) Cholesterol predicts stroke mortality in the Women's Pooling Project. *Stroke* 33:1863-1868.
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 66:232-245.
- Inaba M, White L, Bell C, Chen R, Petrovitch H, Launer L, Abbott RD, Ross GW, Masaki K (2011) White matter lesions on brain magnetic resonance imaging scan and 5-year cognitive decline: the Honolulu-Asia aging study. *J Am Geriatr Soc* 59:1484-1489.
- Inzitari D, Di Carlo A, Pracucci G, Lamassa M, Vanni P, Romanelli M, Spolveri S, Adriani P, Meucci I, Landini G, Ghetti A (1998) Incidence and determinants of poststroke dementia as defined by an informant interview method in a hospital-based stroke registry. *Stroke* 29:2087-2093.
- Iso H, Jacobs DR, Jr., Wentworth D, Neaton JD, Cohen JD (1989) Serum cholesterol levels and six-year mortality from stroke in 350,977 men screened for the multiple risk factor intervention trial. *N Engl J Med* 320:904-910.
- Jablonski M, Maciejewski R, Januszewski S, Ulamek M, Pluta R (2011) One year follow up in ischemic brain injury and the role of Alzheimer factors. *Physiol Res* 60 Suppl 1:S113-119.
- Jablonski M, Kiryk A, Ulamek M, Januszewski S, Pluta R, Kaczmarek L (2010) Animal model for human investigation and rehabilitation in Alzheimer type cognitive deficits. Bologna: 6th world congress of neurorehabilitation international proceedings.
- Jacobs MA, Zhang ZG, Knight RA, Soltanian-Zadeh H, Goussev AV, Peck DJ, Chopp M (2001) A model for multiparametric mri tissue characterization in experimental cerebral ischemia with histological validation in rat: part 1. *Stroke* 32:943-949.
- Jaillard A, Martin CD, Garambois K, Lebas JF, Hommel M (2005) Vicarious function within the human primary motor cortex? A longitudinal fMRI stroke study. *Brain* 128:1122-1138.
- Jeong BO, Kang HJ, Bae KY, Kim SW, Kim JM, Shin IS, Kim JT, Park MS, Cho KH, Yoon JS (2012) Determinants of quality of life in the acute stage following stroke. *Psychiatry Investig* 9:127-133.
- Jorm AF, Masaki KH, Petrovitch H, Ross GW, White LR (2005) Cognitive deficits 3 to 6 years before dementia onset in a population sample: the Honolulu-Asia aging study. *J Am Geriatr Soc* 53:452-455.

- Justicia C, Ramos-Cabrer P, Hoehn M (2008) MRI detection of secondary damage after stroke: chronic iron accumulation in the thalamus of the rat brain. *Stroke* 39:1541-1547.
- Kameyama M, Suzuki J, Shirane R, Ogawa A (1985) A new model of bilateral hemispheric ischemia in the rat--three vessel occlusion model. *Stroke* 16:489-493.
- Kaneko D, Nakamura N, Ogawa T (1985) Cerebral infarction in rats using homologous blood emboli: development of a new experimental model. *Stroke* 16:76-84.
- Karalis F, Soubasi V, Georgiou T, Nakas CT, Simeonidou C, Guiba-Tziampiri O, Spandou E (2011) Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced behavioral deficits and brain injury in the neonatal rat brain. *Brain Res* 1425:98-110.
- Karhunen H, Pitkanen A, Virtanen T, Gureviciene I, Pussinen R, Ylinen A, Sivenius J, Nissinen J, Jolkkonen J (2003) Long-term functional consequences of transient occlusion of the middle cerebral artery in rats: a 1-year follow-up of the development of epileptogenesis and memory impairment in relation to sensorimotor deficits. *Epilepsy Res* 54:1-10.
- Karki K, Knight RA, Shen LH, Kapke A, Lu M, Li Y, Chopp M (2010) Chronic brain tissue remodeling after stroke in rat: a 1-year multiparametric magnetic resonance imaging study. *Brain Res* 1360:168-176.
- Karl JM, Alaverdashvili M, Cross AR, Whishaw IQ (2010) Thinning, movement, and volume loss of residual cortical tissue occurs after stroke in the adult rat as identified by histological and magnetic resonance imaging analysis. *Neuroscience* 170:123-137.
- Kastrup A, Engelhorn T, Beaulieu C, de Crespigny A, Moseley ME (1999) Dynamics of cerebral injury, perfusion, and blood-brain barrier changes after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neurol Sci* 166:91-99.
- Kiely DK, Wolf PA, Cupples LA, Beiser AS, Myers RH (1993) Familial aggregation of stroke. The Framingham Study. *Stroke* 24:1366-1371.
- Kiryk A, Pluta R, Figiel I, Mikosz M, Ulamek M, Niewiadomska G, Jablonski M, Kaczmarek L (2011) Transient brain ischemia due to cardiac arrest causes irreversible long-lasting cognitive injury. *Behav Brain Res* 219:1-7.
- Koh JY (2001) Zinc and disease of the brain. *Mol Neurobiol* 24:99-106.
- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G (1986) Experimental studies of ischemic brain edema: 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Japan Stroke Journal* 8:1-8.
- Kokmen E, Whisnant JP, O'Fallon WM, Chu CP, Beard CM (1996) Dementia after ischemic stroke: a population-based study in Rochester, Minnesota (1960-1984). *Neurology* 46:154-159.
- Kraft P, Schwarz T, Pochet L, Stoll G, Kleinschnitz C (2010) COU254, a specific 3-carboxamide-coumarin inhibitor of coagulation factor XII, does not protect mice from acute ischemic stroke. *Exp Transl Stroke Med* 2:5.
- Kreisel SH, Bazner H, Hennerici MG (2006) Pathophysiology of stroke rehabilitation: temporal aspects of neuro-functional recovery. *Cerebrovasc Dis* 21:6-17.

- Kuroiwa T, Ting P, Martinez H, Klatzo I (1985) The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. *Acta Neuropathol* 68:122-129.
- Langdon KD, Granter-Button S, Corbett D (2008) Persistent behavioral impairments and neuroinflammation following global ischemia in the rat. *Eur J Neurosci* 28:2310-2318.
- Lauer KK, Shen H, Stein EA, Ho KC, Kampine JP, Hudetz AG (2002) Focal cerebral ischemia in rats produced by intracarotid embolization with viscous silicone. *Neurol Res* 24:181-190.
- Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Grenier P, Cabanis E, Laval-Jeantet M (1986) MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology* 161:401-407.
- Ledezma CJ, Wintermark M (2009) Multimodal CT in stroke imaging: new concepts. *Radiol Clin North Am* 47:109-116.
- Lee SR, Kim HY, Rogowska J, Zhao BQ, Bhide P, Parent JM, Lo EH (2006) Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. *J Neurosci* 26:3491-3495.
- Lesniak M, Bak T, Czepiel W, Seniow J, Czlonkowska A (2008) Frequency and prognostic value of cognitive disorders in stroke patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* 26:356-363.
- Letourneur A, Freret T, Roussel S, Boulouard M, Divoux D, Toutain J, Bernaudin M, Schumann-Bard P, Bouet V, Touzani O (2012) Maternal hypertension during pregnancy modifies the response of the immature brain to hypoxia-ischemia: sequential MRI and behavioral investigations. *Exp Neurol* 233:264-272.
- Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R (2002) Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. *Lancet* 360:1903-1913.
- Leys D, Henon H, Mackowiak-Cordoliani MA, Pasquier F (2005) Poststroke dementia. *Lancet Neurol* 4:752-759.
- Li F, Omae T, Fisher M (1999) Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke* 30:2464-2470; discussion 2470-2461.
- Li LX, Cheng YF, Lin HB, Wang C, Xu JP, Zhang HT (2011) Prevention of cerebral ischemia-induced memory deficits by inhibition of phosphodiesterase-4 in rats. *Metab Brain Dis* 26:37-47.
- Li TJ, Qiu Y, Yang PY, Rui YC, Chen WS (2007) Timosaponin B-II improves memory and learning dysfunction induced by cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett* 421:147-151.
- Liman TG, Heuschmann PU, Endres M, Floel A, Schwab S, Kolominsky-Rabas PL (2011) Changes in cognitive function over 3 years after first-ever stroke and predictors of cognitive impairment and long-term cognitive stability: the Erlangen Stroke Project. *Dement Geriatr Cogn Disord* 31:291-299.

- Lindenstrom E, Boysen G, Nyboe J (1994) Influence of total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol, and triglycerides on risk of cerebrovascular disease: the Copenhagen City Heart Study. *Bmj* 309:11-15.
- Liu YF, Chen HI, Yu L, Kuo YM, Wu FS, Chuang JI, Liao PC, Jen CJ (2008) Upregulation of hippocampal TrkB and synaptotagmin is involved in treadmill exercise-enhanced aversive memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* 90:81-89.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84-91.
- Lopez-Neblina F, Toledo AH, Toledo-Pereyra LH (2005) Molecular biology of apoptosis in ischemia and reperfusion. *J Invest Surg* 18:335-350.
- Mahoney FI, Barthel DW (1965) Functional Evaluation: The Barthel Index. *Md State Med J* 14:61-65.
- Malli R, Graier WF (2010) Mitochondrial Ca²⁺ channels: Great unknowns with important functions. *FEBS Lett* 584:1942-1947.
- Marche K, Danel T, Bordet R (2011) Fetal alcohol-induced hyperactivity is reversed by treatment with the PPARalpha agonist fenofibrate in a rat model. *Psychopharmacology (Berl)* 214:285-296.
- Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI (1994) The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 17:251-257.
- Mizrahi EH, Waitzman A, Arad M, Adunsky A (2011) Gender and the functional outcome of elderly ischemic stroke patients. *Arch Gerontol Geriatr* 55:438-441.
- Mohr JP, Gautier JC, Hier D, Stein RW (1986) *Stroke, Pathophysiology, Diagnosis and Management*. New York.
- Montoya CP, Campbell-Hope LJ, Pemberton KD, Dunnett SB (1991) The "staircase test": a measure of independent forelimb reaching and grasping abilities in rats. *J Neurosci Methods* 36:219-228.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47-60.
- Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297:681-683.
- Muller MJ, Greverus D, Dellani PR, Weibrich C, Wille PR, Scheurich A, Stoeter P, Fellgiebel A (2005) Functional implications of hippocampal volume and diffusivity in mild cognitive impairment. *Neuroimage* 28:1033-1042.
- Napieralski JA, Butler AK, Chesselet MF (1996) Anatomical and functional evidence for lesion-specific sprouting of corticostriatal input in the adult rat. *J Comp Neurol* 373:484-497.
- Neal B, MacMahon S, Chapman N (2000) Effects of ACE inhibitors, calcium antagonists, and other blood-pressure-lowering drugs: results of prospectively designed overviews of randomised trials. *Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. Lancet* 356:1955-1964.

- New PW, Buchbinder R (2006) Critical appraisal and review of the Rankin scale and its derivatives. *Neuroepidemiology* 26:4-15.
- Nihashi T, Inao S, Kajita Y, Kawai T, Sugimoto T, Niwa M, Kabeya R, Hata N, Hayashi S, Yoshida J (2001) Expression and distribution of beta amyloid precursor protein and beta amyloid peptide in reactive astrocytes after transient middle cerebral artery occlusion. *Acta Neurochir (Wien)* 143:287-295.
- Nikkhah G, Rosenthal C, Hedrich HJ, Samii M (1998) Differences in acquisition and full performance in skilled forelimb use as measured by the 'staircase test' in five rat strains. *Behav Brain Res* 92:85-95.
- NINDS (1995) Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 333:1581-1587.
- Nishio K, Ihara M, Yamasaki N, Kalaria RN, Maki T, Fujita Y, Ito H, Oishi N, Fukuyama H, Miyakawa T, Takahashi R, Tomimoto H (2010) A mouse model characterizing features of vascular dementia with hippocampal atrophy. *Stroke* 41:1278-1284.
- Papadopoulos CM, Tsai SY, Cheatwood JL, Bollnow MR, Kolb BE, Schwab ME, Kartje GL (2006) Dendritic plasticity in the adult rat following middle cerebral artery occlusion and Nogo-a neutralization. *Cereb Cortex* 16:529-536.
- Park JW, Bang MS, Kwon BS, Park YK, Kim DW, Shon SM, Jeong SW, Lee DK, Kim DE (2010) Early treadmill training promotes motor function after hemorrhagic stroke in rats. *Neurosci Lett* 471:104-108.
- Pautler RG (2004) In vivo, trans-synaptic tract-tracing utilizing manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *NMR Biomed* 17:595-601.
- Pautler RG, Silva AC, Koretsky AP (1998) In vivo neuronal tract tracing using manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn Reson Med* 40:740-748.
- Paxinos G, Watson C, Pennisi M, Topple A (1985) Bregma, lambda and the interaural midpoint in stereotaxic surgery with rats of different sex, strain and weight. *J Neurosci Methods* 13:139-143.
- Pedersen PM, Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS (1995) Aphasia in acute stroke: incidence, determinants, and recovery. *Ann Neurol* 38:659-666.
- Petrault O, Bastide M, Cotellet N, Gele P, Gautier S, Laprais M, Vamecq J, Duriez P, Bordet R (2004) The neuroprotective effect of the antioxidant flavonoid derivate di-tert-butylhydroxyphenyl is parallel to the preventive effect on post-ischemic Kir2.x impairment but not to post-ischemic endothelial dysfunction. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 370:395-403.
- Plaisier F, Bastide M, Lecointe C, Pétrault M, Bordet R (2008a) CGMP modulation of voltage-dependent potassium channels in cerebral vascular smooth muscle cells after ischemia reperfusion. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 22:94.
- Plaisier F, Bastide M, Ouk T, Petrault O, Laprais M, Stolc S, Bordet R (2008b) Stobadine-induced hastening of sensorimotor recovery after focal ischemia/reperfusion is associated with cerebrovascular protection. *Brain Res* 1208:240-249.

- Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Dore JJ, Corbett D (2009) Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats. *Stroke* 40:1490-1495.
- Pluta R, Ulamek M, Jablonski M (2009) Alzheimer's mechanisms in ischemic brain degeneration. *Anat Rec (Hoboken)* 292:1863-1881.
- Pluta R, Jablonski M, Czuczwar SJ (2012) Postischemic dementia with Alzheimer phenotype: selectively vulnerable versus resistant areas of the brain and neurodegeneration versus beta-amyloid peptide. *Folia Neuropathol* 50:101-109.
- Popa-Wagner A, Schroder E, Walker LC, Kessler C (1998) beta-Amyloid precursor protein and ss-amyloid peptide immunoreactivity in the rat brain after middle cerebral artery occlusion: effect of age. *Stroke* 29:2196-2202.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977) Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266:730-732.
- Purdy PD, Devous MD, Sr., Batjer HH, White CL, 3rd, Meyer Y, Samson DS (1989) Microfibrillar collagen model of canine cerebral infarction. *Stroke* 20:1361-1367.
- Qi JP, Wu H, Yang Y, Wang DD, Chen YX, Gu YH, Liu T (2007) Cerebral ischemia and Alzheimer's disease: the expression of amyloid-beta and apolipoprotein E in human hippocampus. *J Alzheimers Dis* 12:335-341.
- Rankin J (1957) Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60. III. Diagnosis and treatment. *Scott Med J* 2:254-268.
- Rapp JH, Pan XM, Yu B, Swanson RA, Higashida RT, Simpson P, Saloner D (2003) Cerebral ischemia and infarction from atheroemboli <100 microm in size. *Stroke* 34:1976-1980.
- Ratan RR, Siddiq A, Smirnova N, Karpisheva K, Haskew-Layton R, McConoughey S, Langley B, Estevez A, Huerta PT, Volpe B, Roy S, Sen CK, Gazaryan I, Cho S, Fink M, LaManna J (2007) Harnessing hypoxic adaptation to prevent, treat, and repair stroke. *J Mol Med (Berl)* 85:1331-1338.
- Rickhag M, Wieloch T, Gido G, Elmer E, Krogh M, Murray J, Lohr S, Bitter H, Chin DJ, von Schack D, Shamloo M, Nikolich K (2006) Comprehensive regional and temporal gene expression profiling of the rat brain during the first 24 h after experimental stroke identifies dynamic ischemia-induced gene expression patterns, and reveals a biphasic activation of genes in surviving tissue. *J Neurochem* 96:14-29.
- Roof RL, Schielke GP, Ren X, Hall ED (2001) A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke* 32:2648-2657.
- Ruscher K, Kuric E, Wieloch T (2012) Levodopa treatment improves functional recovery after experimental stroke. *Stroke* 43:507-513.
- Ryzenman JM, Rothholtz VS, Wiet RJ (2007) Porencephalic cyst: a review of the literature and management of a rare cause of cerebrospinal fluid otorrhea. *Otol Neurotol* 28:381-386.

- Sabuncu MR, Desikan RS, Sepulcre J, Yeo BT, Liu H, Schmansky NJ, Reuter M, Weiner MW, Buckner RL, Sperling RA, Fischl B (2011) The dynamics of cortical and hippocampal atrophy in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 68:1040-1048.
- Sachdev PS, Brodaty H, Valenzuela MJ, Lorentz L, Looi JC, Berman K, Ross A, Wen W, Zagami AS (2006) Clinical determinants of dementia and mild cognitive impairment following ischaemic stroke: the Sydney Stroke Study. *Dement Geriatr Cogn Disord* 21:275-283.
- Schabitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, Kuhn HG (2007) Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 38:2165-2172.
- Schaller B, Graf R (2004) Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:351-371.
- Scheidtmann K, Fries W, Muller F, Koenig E (2001) Effect of levodopa in combination with physiotherapy on functional motor recovery after stroke: a prospective, randomised, double-blind study. *Lancet* 358:787-790.
- Schlegel D, Kolb SJ, Luciano JM, Tovar JM, Cucchiara BL, Liebeskind DS, Kasner SE (2003) Utility of the NIH Stroke Scale as a predictor of hospital disposition. *Stroke* 34:134-137.
- Schmidt-Kastner R, Truettner J, Lin B, Zhao W, Saul I, Busto R, Ginsberg MD (2001) Transient changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusions in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 92:157-166.
- Sekeljic V, Bataveljic D, Stamenkovic S, Ulamek M, Jablonski M, Radenovic L, Pluta R, Andjus PR (2012) Cellular markers of neuroinflammation and neurogenesis after ischemic brain injury in the long-term survival rat model. *Brain Struct Funct* 217:411-420.
- Sharkey J, Ritchie IM, Kelly PA (1993) Perivascular microapplication of endothelin-1: a new model of focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:865-871.
- Shi J, Yang SH, Stubbley L, Day AL, Simpkins JW (2000) Hypoperfusion induces overexpression of beta-amyloid precursor protein mRNA in a focal ischemic rodent model. *Brain Res* 853:1-4.
- Shimizu T, Hosaki A, Hino T, Sato M, Komori T, Hirai S, Rossini PM (2002) Motor cortical disinhibition in the unaffected hemisphere after unilateral cortical stroke. *Brain* 125:1896-1907.
- Sigler A, Mohajerani MH, Murphy TH (2009) Imaging rapid redistribution of sensory-evoked depolarization through existing cortical pathways after targeted stroke in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:11759-11764.
- Simerabet M, Robin E, Aristi I, Adamczyk S, Tavernier B, Vallet B, Bordet R, Lebuffe G (2008) Preconditioning by an in situ administration of hydrogen peroxide: involvement of reactive oxygen species and mitochondrial ATP-dependent potassium channel in a cerebral ischemia-reperfusion model. *Brain Res* 1240:177-184.

- Soyama Y, Miura K, Morikawa Y, Nishijo M, Nakanishi Y, Naruse Y, Kagamimori S, Nakagawa H (2003) High-density lipoprotein cholesterol and risk of stroke in Japanese men and women: the Oyabe Study. *Stroke* 34:863-868.
- Spieler JF, Lanoe JL, Amarenco P (2004) Costs of stroke care according to handicap levels and stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis* 17:134-142.
- Steffenach HA, Witter M, Moser MB, Moser EI (2005) Spatial memory in the rat requires the dorsolateral band of the entorhinal cortex. *Neuron* 45:301-313.
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE (1995) Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke* 26:2135-2144.
- Szydłowska K, Tymianski M (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47:122-129.
- Takatsuru Y, Fukumoto D, Yoshitomo M, Nemoto T, Tsukada H, Nabekura J (2009) Neuronal circuit remodeling in the contralateral cortical hemisphere during functional recovery from cerebral infarction. *J Neurosci* 29:10081-10086.
- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981) Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:53-60.
- Tanaka R, Komine-Kobayashi M, Mochizuki H, Yamada M, Furuya T, Migita M, Shimada T, Mizuno Y, Urabe T (2003) Migration of enhanced green fluorescent protein expressing bone marrow-derived microglia/macrophage into the mouse brain following permanent focal ischemia. *Neuroscience* 117:531-539.
- Tang X, Wang C, Xia L, Zhu W, Zhao L, Zhu W (2011) Volumetric MRI and (1)H MRS study of hippocampus in unilateral MCAO patients: Relationship between hippocampal secondary damage and cognitive disorder following stroke. *Eur J Radiol* 81:2788-2793.
- Tatemichi TK, Paik M, Bagiella E, Desmond DW, Stern Y, Sano M, Hauser WA, Mayeux R (1994) Risk of dementia after stroke in a hospitalized cohort: results of a longitudinal study. *Neurology* 44:1885-1891.
- Ten VS, Wu EX, Tang H, Bradley-Moore M, Fedarau MV, Ratner VI, Stark RI, Gingrich JA, Pinsky DJ (2004) Late measures of brain injury after neonatal hypoxia-ischemia in mice. *Stroke* 35:2183-2188.
- Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2006) Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24:739-747.
- Tsai SY, Markus TM, Andrews EM, Cheatwood JL, Emerick AJ, Mir AK, Schwab ME, Kartje GL (2007) Intrathecal treatment with anti-Nogo-A antibody improves functional recovery in adult rats after stroke. *Exp Brain Res* 182:261-266.
- Tuhim S, Godbold JH, Goldman ME, Horowitz DR, Weinberger J (1997) The Minorities Risk Factors and Stroke Study (MRFASS). Design, methods and baseline characteristics. *Neuroepidemiology* 16:224-233.

- Tuzun Y, Solmaz I, Sengul G, Izci Y (2010) The complications of cerebral hydatid cyst surgery in children. *Childs Nerv Syst* 26:47-51.
- van der Zijden JP, van der Toorn A, van der Marel K, Dijkhuizen RM (2008a) Longitudinal in vivo MRI of alterations in perilesional tissue after transient ischemic stroke in rats. *Exp Neurol* 212:207-212.
- van der Zijden JP, Wu O, van der Toorn A, Roeling TP, Bleys RL, Dijkhuizen RM (2007) Changes in neuronal connectivity after stroke in rats as studied by serial manganese-enhanced MRI. *Neuroimage* 34:1650-1657.
- van der Zijden JP, Bouts MJ, Wu O, Roeling TA, Bleys RL, van der Toorn A, Dijkhuizen RM (2008b) Manganese-enhanced MRI of brain plasticity in relation to functional recovery after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:832-840.
- van Groen T, Puurunen K, Maki HM, Sivenius J, Jolkkonen J (2005) Transformation of diffuse beta-amyloid precursor protein and beta-amyloid deposits to plaques in the thalamus after transient occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Stroke* 36:1551-1556.
- van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC, Schouten HJ, van Gijn J (1988) Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke* 19:604-607.
- Velayudhan L, Proitsi P, Westman E, Muehlboeck JS, Mecocci P, Vellas B, Tsolaki M, Kloszewska I, Soininen H, Spenger C, Hodges A, Powell J, Lovestone S, Simmons A (2012) Entorhinal Cortex Thickness Predicts Cognitive Decline in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*.
- Verdelho A, Henon H, Lebert F, Pasquier F, Leys D (2004) Depressive symptoms after stroke and relationship with dementia: A three-year follow-up study. *Neurology* 62:905-911.
- Virley D, Beech JS, Smart SC, Williams SC, Hodges H, Hunter AJ (2000) A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behavior. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:563-582.
- von Kummer R, Allen KL, Holle R, Bozzao L, Bastianello S, Manelfe C, Bluhmki E, Ringleb P, Meier DH, Hacke W (1997) Acute stroke: usefulness of early CT findings before thrombolytic therapy. *Radiology* 205:327-333.
- Ward NS (2005) Neural plasticity and recovery of function. *Prog Brain Res* 150:527-535.
- Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol* 17:497-504.
- Weber R, Wegener S, Ramos-Cabrera P, Wiedermann D, Hoehn M (2005) MRI detection of macrophage activity after experimental stroke in rats: new indicators for late appearance of vascular degradation? *Magn Reson Med* 54:59-66.
- Wieloch T, Nikolich K (2006) Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Curr Opin Neurobiol* 16:258-264.
- Wintermark M, Reichhart M, Cuisenaire O, Maeder P, Thiran JP, Schnyder P, Bogousslavsky J, Meuli R (2002) Comparison of admission perfusion computed

- tomography and qualitative diffusion- and perfusion-weighted magnetic resonance imaging in acute stroke patients. *Stroke* 33:2025-2031.
- Wolf PA, D'Agostino RB, O'Neal MA, Sytkowski P, Kase CS, Belanger AJ, Kannel WB (1992) Secular trends in stroke incidence and mortality. The Framingham Study. *Stroke* 23:1551-1555.
- Wolfe CD, Crichton SL, Heuschmann PU, McKeivitt CJ, Toschke AM, Grieve AP, Rudd AG (2011) Estimates of outcomes up to ten years after stroke: analysis from the prospective South London Stroke Register. *PLoS Med* 8:e1001033.
- Xiao Y, Guan ZZ, Wu CX, Li Y, Kuang SX, Pei JJ (2012) Correlations between cholinesterase activity and cognitive scores in post-ischemic rats and patients with vascular dementia. *Cell Mol Neurobiol* 32:399-407.
- Xie M, Yi C, Luo X, Xu S, Yu Z, Tang Y, Zhu W, Du Y, Jia L, Zhang Q, Dong Q, Zhu W, Zhang X, Bu B, Wang W (2011) Glial gap junctional communication involvement in hippocampal damage after middle cerebral artery occlusion. *Ann Neurol* 70:121-132.
- Yamada K, Nabeshima T (2003) Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 91:267-270.
- Yamori Y, Horie R, Handa H, Sato M, Fukase M (1976) Pathogenetic similarity of strokes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats and humans. *Stroke* 7:46-53.
- Yang DN, Townsend JC, Ilsen PF, Bright DC, Welton TH (1997) Traumatic porencephalic cyst of the brain. *J Am Optom Assoc* 68:519-526.
- Yu SP, Yeh CH, Sensi SL, Gwag BJ, Canzoniero LM, Farhangrazi ZS, Ying HS, Tian M, Dugan LL, Choi DW (1997) Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. *Science* 278:114-117.
- Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S, Gee JC, Gerig G (2006) User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage* 31:1116-1128.
- Zhang F, Xu S, Iadecola C (1995) Time dependence of effect of nitric oxide synthase inhibition on cerebral ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:595-601.
- Zhang L, Fu F, Zhang X, Zhu M, Wang T, Fan H (2010) Escin attenuates cognitive deficits and hippocampal injury after transient global cerebral ischemia in mice via regulating certain inflammatory genes. *Neurochem Int* 57:119-127.
- Zhang Q, Gao T, Luo Y, Chen X, Gao G, Gao X, Zhou Y, Dai J (2012) Transient focal cerebral ischemia/reperfusion induces early and chronic axonal changes in rats: its importance for the risk of Alzheimer's disease. *PLoS One* 7:e33722.
- Zhang X, Patel A, Horibe H, Wu Z, Barzi F, Rodgers A, MacMahon S, Woodward M (2003) Cholesterol, coronary heart disease, and stroke in the Asia Pacific region. *Int J Epidemiol* 32:563-572.
- Zhao LR, Mattsson B, Johansson BB (2000) Environmental influence on brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 97:177-184.

Zvejniece L, Svalbe B, Liepinsh E, Pulks E, Dambrova M (2012) The sensorimotor and cognitive deficits in rats following 90- and 120-min transient occlusion of the middle cerebral artery. *J Neurosci Methods* 208:197-204.

Résumé

Un nombre non négligeable de patients ayant subi un accident vasculaire cérébral (AVC) vont développer une démence parfois associée à un handicap fonctionnel résiduel. Mon travail a pour but de mettre en place un suivi à long terme de l'ischémie cérébrale chez le rat afin de suivre et d'identifier de manière concomitante l'évolution des lésions cérébrales, les déficits fonctionnels afin d'explorer les mécanismes sous-jacents au développement de la démence post-ischémique. Des rats mâles de souche Wistar ont subi une ischémie cérébrale transitoire. Ces rats sont suivis par IRM à 24 heures, 7 jours, puis 1, 2, 4 et 6 mois de post-ischémie. En parallèle de ces examens, les animaux subissent une batterie de tests comportementaux, comprenant à la fois une étude des fonctions motrices et mnésiques. Après le sacrifice, les cerveaux sont récupérés à des fins histologiques et moléculaires. Des déficits moteurs et mnésiques sont décelés durant notre étude au sein du groupe I/R. L'étude *in vivo* par IRM a démontré une différenciation de la lésion et du tissu associé, dès 7 jours de reperfusion ainsi que l'apparition de différentes zones d'atrophie apparaissant au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal dès 1 mois post-ischémie et perdurant le long de l'étude. L'étude histologique montre une diminution significative de la surface cellulaire dans les différentes zones hippocampiques associée à une moindre expression du facteur neurotrophique BDNF qui expliquerait le phénomène d'atrophie. Ces résultats prouvent la pertinence du modèle d'étude préclinique à long terme chez le rat pour reproduire des troubles du comportement en post-AVC.

Abstract

Patients who have had a stroke have a higher prevalence of dementia associated with functional handicap affecting the quality of life and creating a loss of autonomy. My work aims to develop a long term model of stroke in rat to identify cerebral lesions and the associated behavior deficits as well as the involved cellular mechanisms. Male Wistar rats undergo transient ischemia/reperfusion. MRI was performed at 24 hours, 7 days, 1, 2, 4 and 6 months after operation. In parallel, behavioral tests were assessed to follow motor and mnesic functions. After sacrifice, brains are removed to made histological and molecular studies. Motor and mnesic deficits appeared during our study. MRI studies showed that lesion differentiated at 7 days of reperfusion and T2-MRI evidenced atrophies appearing since 1 month post-ischemia in entorhinal cortex and hippocampus. Histological studies evidenced a decreased cellular surface in hippocampal regions associated to a decreased expression of the neurotrophic factor BDNF which could explain atrophies. These results proved that this long-term ischemic model in rat is a good one to induce behavioral deficits like functional problems appearing at distance in post-stroke patients.