



HAL
open science

Étude des propriétés neuroprotectrices et neurorégénératives du MLC901, issu de la Médecine Traditionnelle Chinoise face à l'ischémie globale et au traumatisme crânien chez le rongeur

Hervé Quintard

► **To cite this version:**

Hervé Quintard. Étude des propriétés neuroprotectrices et neurorégénératives du MLC901, issu de la Médecine Traditionnelle Chinoise face à l'ischémie globale et au traumatisme crânien chez le rongeur. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2014. Français. NNT : 2014NICE4112 . tel-01132355

HAL Id: tel-01132355

<https://theses.hal.science/tel-01132355>

Submitted on 17 Mar 2015

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

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

UNIVERSITE DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
U.F.R Sciences

THESE

Présentée pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences de la Vie
De l'Université de Nice-Sophia Antipolis

Par

Hervé QUINTARD

**Etude des propriétés neuroprotectrices et neurorégénératives du MLC901,
issu de la Médecine Traditionnelle Chinoise face à l'ischémie globale et au
traumatisme crânien chez le rongeur**

Dirigée par **Dr Catherine HEURTEAUX**

Soutenue le **18 décembre 2014**, devant le jury

Pr LAZDUNSKI Michel	Président
Dr BADAUT Jerome	Rapporteur
Pr MANTZ Jean	Rapporteur
Pr BRUDER Nicolas	Examineur
Dr ONTENIENTE Brigitte	Examineur
Pr ICHAI Carole	Examineur
Dr HEURTEAUX Catherine	Directrice de thèse

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire IPMC. CNRS.UMR6097

660 Route des Lucioles, 06560 Valbonne, Sophia Antipolis

Etude des propriétés neuroprotectrices et neurorégénératives du MLC901, issu de la Médecine Traditionnelle Chinoise face à l'ischémie globale et au traumatisme crânien chez le rongeur

RESUME

L'arrêt cardio circulatoire et le traumatisme crânien sont responsables de lésions cérébrales dont les conséquences médico économiques sont un réel enjeu de santé publique. Malgré des espoirs importants lors des travaux expérimentaux, la majorité des traitements neuroprotecteurs se sont révélés être des échecs lors du passage à la clinique humaine.

Riche d'une expérience clinique vieille de plusieurs millénaires, la Médecine Chinoise Traditionnelle a démontré son efficacité en clinique sur des patients victimes d'accidents vasculaires cérébraux. Le MLC 601, et sa formule simplifiée le MLC901, produits issus de celle-ci, ont déjà été étudiés dans un travail expérimental réalisé sur un modèle d'ischémie focale dans le laboratoire d'accueil. L'effet pléiotrope du produit avait alors été souligné. L'objet de notre travail a été d'étudier les effets neuroprotecteurs et neurorégénérateurs du MLC901 sur 2 autres modèles expérimentaux de lésions cérébrales : l'ischémie globale, mimant les conséquences cérébrales d'un arrêt cardiaque et le traumatisme crânien par percussion liquidienne latérale. Nous insistons, dans ce travail, sur l'effet neuroprotecteur du produit agissant sur les mécanismes de nécrose, d'apoptose et de stress oxydant se mettant en place après la lésion initiale. Nous retrouvons également une action neurorégénérative avec une stimulation de la neurogenèse induite par la lésion. L'ensemble de ces mécanismes cellulaires mis en place est associé à une amélioration de la récupération des fonctions neurologiques des animaux mis en évidence par l'utilisation de tests comportementaux moteurs et cognitifs.

Nous démontrons donc dans ce travail, l'effet neuroprotecteur et neurorégénérateur du MLC901 sur deux modèles expérimentaux de « cérébro lésion », l'un ischémique et l'autre traumatique. Cette approche, basée sur les preuves expérimentales est une étape essentielle à une ouverture de la médecine occidentale vers une médecine traditionnelle basée sur l'expérience.

Mots clefs :

Neuroprotection

Neurogenèse

Ischémie globale

Traumatisme crânien

MLC901

Neuroprotective and neuroregenerative effects of MLC901 in global ischemia and traumatic brain injury models in rats

ABSTRACT

Cardiac arrest and traumatic brain injury are a socio economic health problem. Despite lot of hopes on neuroprotective therapies, few confirmed promising experimental results in clinical studies.

Traditional Chinese Medicine has been used for several centuries. Despite lot of clinical investigations, few data are available on mechanisms involved in their effects. Interesting results have been published in stroke patients, and experimental studies using MLC601 and MLC901 have been conducted in mouse focal ischemia models. The multiple mechanisms of action, neuroprotective and neuroregenerative, of these treatments have been highlighted. The purpose of our study was to analyse the neuroprotective and neuroregenerative actions of MLC901 on rat global ischemia and traumatic brain injury models.

In these models, we confirmed the neuroprotective action on necrosis, apoptosis and oxidative stress and the neuroregenerative action by the way of neurogenesis activation. These cellular actions are associated with functional recovery in the two models.

We confirmed in these two experimental models, the neuroprotective and neuroregenerative effects of MLC901 on post ischemic or post traumatic brain injuries. This approach is essential for Traditional Chinese Medicine to be accepted by occidental one.

Key words:

Neuroprotection

Neurogenesis

Global ischemia

Traumatic brain injury

MLC901

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	p.2
RESUME	p.6
TABLE DES MATIERES	p.8
LISTE DES FIGURES	p.9
LISTE DES TABLEAUX	p.13
LISTE DES ABBREVIATIONS	p.14
AVANT PROPOS	p.16
LE « CEREBROLESE » UN ENJEU ECONOMIQUE	p.18
MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES INDUITS PAR L'ACR ET LE TRAUMATISME CRANIEN	p.24
LA QUETE DE LA NEUROPROTECTION	p.50
UN CONCEPT REVOLUTIONNAIRE : LA NEUROGENESE	p.57
LA MEDECINE TRADITIONNELLE CHINOISE : UNE ALTERNATIVE ?	p.67
EVALUATION DE L'EFFET DU MLC901 SUR UN MODELE D'ISCHEMIE GLOBALE	p.85
EVALUATION DE L'EFFET DU MLC901 SUR UN MODELE DE TRAUMATISME CRANIEN	p.117
CONCLUSION	p.174
BIBLIOGRAPHIE	p.179
ANNEXE	p. 204

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Comparaison de l'état de conscience avant et au bout d'un an de réhabilitation post-traumatique* p.24
- Figure 2: Mécanismes moléculaires induits par l'ischémie cérébrale (Brott and Bogousslavsky, 2000)* p.30
- Figure 3: Cascades physiopathologiques mises en jeu en post-ischémie et conduisant à un oedème cytotoxique et vasogénique (Gasche and Copin, 2003)* p.34
- Figure 4: Décours temporel des mécanismes de souffrance et de protection neuronale suite à une ischémie* p.34
- Figure 5: Transmission de l'onde traumatique intracérébrale (El Sayed et al., 2008)* p.36
- Figure 6: Onde de pression au niveau du coup (frontal) et du contre coup (postérieur) (El Sayed et al., 2008)* p.36
- Figure 7: Etude biomécanique des forces induites au niveau cérébral suite à un impact frontal ou latéral* p.38
- Figure 8: Expression AQP4 au cours du temps en post- trauma (Rao et al.).* p.47
- Figure 9: Décours temporel des mécanismes impliqués dans la Neuroprotection et dans la réparation tissulaire post-ischémie et post-traumatique.* p.60
- Figure 10: Zones cérébrales de Neurogénèse* p.60
- Fig 11: Mécanismes impliqués dans la Neurogénèse et la Vasculogénèse* p.63
- Figure 12 : Récupération fonctionnelle évaluée à 1, 3 mois et à la fin de l'étude (Siddiqui et al.)* p.72
- Figure 13: Récupération motrice évaluée à 1, 2, 3 mois et à la fin de l'étude (Siddiqui et al.)* p.73
- Figure 14 : Flow shart CHIMES (Chen et al.)* p.77
- Figure 15: Comparaison du score de Rankin modifié entre le groupe Placebo et le groupe MLC601* p.78
- Figure 16: Comparaison des 2 groupes concernant les différents critères évalués (Chen et al.)* p.79
- Figure 17: Métaanalyse du pronostic fonctionnel à la fin de l'étude pour tous les patients(A) et les patients traités à > 48h (Chen et al.)* p.80
- Figure 18: Inhibition de l'onde calcique induite par la privation en oxygene et en glucose par le MLC901(Moha Ou Maati et al.)* p.83

- Figure 19: Potentiel de membrane de neurones corticaux en présence d'un milieu contrôle, un milieu contenant du MLC901 et un milieu enrichi en MLC901 et antagoniste des canaux KATP (Glibenclamide) (Moha Ou Maati et al.) p.83
- Figure 20: Absence d'effet du MLC901 sur les courants potassiques TREK-1, dans des neurones corticaux de souris (AA : Acide Arachidonique) (Moha Ou Maati et al.) p.83
- Figure 21: Prolifération neuronale et synaptique sous MLC601 et 901 sur une culture de neurones corticaux de souris. Cette activation est associée à une augmentation du taux de BDNF. p.84
- Figure 22: Modèle d'ischémie globale décrit par Pulsinelli et al. (1979) p.87
- Figure 23: Pourcentage de survie (A) et densité neuronale (B) dans le CA1 pour des concentrations croissantes de NeuroAid p.92
- Figure 24: Fenêtre thérapeutique du MLC901: Densité neuronale en fonction du délai d'administration p.92
- Figure 25: Effet neuroprotecteur du MLC901 au niveau du CA1 de rats ayant subi une ischémie globale et analysés après 7 jours de reperfusion. Coloration au Crésyl violet (20X) (images gauches) et Coloration au fluoro Jade (20X) (images droites). p.95
- Figure 26: Effet du MLC901 sur l'apoptose induite par l'ischémie globale 3 jours post-injure dans le CA1. (A) Marquage TUNEL des cellules apoptotiques; (B) Quantification du marquage cellulaire Tunel au niveau du CA1; (C) Expression immunohistochimique de Bax dans le CA1; (D) Quantification de Bax de l'immunohistochimie; (E) Expression de Bax par Western Blot; (F) Quantification de Bax par Western Blot. p.97
- Figure 27: Voies de signalisation de l'apoptose p.99
- Figure 28: Effet du MLC901 sur la voie de signalisation Akt. (A) Western Blot et (B) Quantification de pAkt représentant le marquage Pi3k/Akt au niveau du CA1 dans le groupe traité et placebo. (B) Expression immunochimique de pAkt dans le CA1 et effet de l'inhibiteur PI3-kinase, LY294002. (C) Quantification de l'expression immunochimique de pAkt, (D) Histogrammes représentant la densité neuronale dans le CA1 après l'injection du LY294002 analysée 7 jours après reperfusion. p.103
- Figure 29: Effet du MLC901 sur la Concentration de MDA dans l'hippocampe après 4 heures de reperfusion. p.106
- Figure 30: Effet stimulateur du MLC901 sur la neurogénèse. (A) Photos montrant les cellules BrdU-positives au niveau du dentate gyrus après 7 jours de reperfusion. (B) Quantification des cellules BrdU-positives et (C) Double marquage neuronal BrdU/DCX après 7 jours de reperfusion. p.108
- Figure 31: Grip strength test p.110

- Figure 32: Histogrammes représentant la tension mesurée maximale au Grip Test à J-1, J3, J10, J15 post-ischémie (* $p < 0,05$ SHAM vs Vehicle, # $p < 0,05$ SHAM vs MLC901, ## $p < 0,05$ Vehicle vs MLC901). p.110
- Figure 33: Piscine de Morris p.111
- Figure 34: le MLC901 diminue les déficits moteurs et cognitifs induits par l'ischémie globale. (A-B) Temps pour atteindre la plateforme dans le test de la piscine de Morris une (A) et 2 semaines post-ischémie (B). * $P < 0.05$ versus sham et MLC901 groupes. (C) Exemples de trajet dans la piscine effectué par les membres de chaque groupe expérimental après 4 jours d'acquisition. (D-E) Pourcentage de temps (D) et de distance de nage (E) dans le quadrant où était localisée la plateforme pendant le test une et deux semaines après la reperfusion. p.113
- Figure: 35 Différents modèles de traumatismes expérimentaux p.120
- Figure 36: Traumatisme crânien par percussion liquidienne latérale p.125
- Figure 37: Densité cellulaire post-traumatique en zone sous lésionnelle (fenêtre thérapeutique) p.128
- Figure38: Lésions de l'hippocampe en fonction de l'intensité croissante de trauma (Qian et al., 1996b) p.130
- Figure 39 : Marquage TTC sur le groupe Placebo et MLC901 p.132
- Figure 40: Volume lésionnel en fonction du temps post-TC p.132
- Figure 41: Marquage par l'acide fuchsine des neurones au niveau du CA3, Dentate gyrus (DG) et Thalamus en fonction du temps post-TC groupe Placebo et groupe MLC901. p.134
- Figure 42 : Volume lésionnel IRM mesuré en T2 dans le groupe Placebo et MLC901 (* $p < 0,05$) p.135
- Figure 43: Dosage sanguin de S100B et NSE à différents temps post-trauma(groupe Placebo (Vehicle), MLC901 et SHAM p.140
- Figure 44: Contenu en eau de l'hémisphère lésé 24 h après le trauma dans le groupe Placebo(Vehicle) et MLC901 p.142
- Figure 45: Visualisation des zones cérébrales d'intérêt (ROI) en IRM p.142
- Figure 46:Variation de l'ADC en fonction du temps dans la région d'intérêt 1, au niveau du traumatisme dans le groupe Placebo et MLC901 p.145
- Figure 47: Effet du MLC901 sur l'expression d'AQP4 2 heures et 7 jours post-trauma en Western Blot (* $p < 0,05$ vs SHAM et # $p < 0,05$ vs vehicle) et immunomarquage AQP4 (vert, flèches) à H24 et J7 post trauma dans les groupes Paceybo et MLC901. p.146

<i>Figure 48: Débit sanguin cérébral post traumatisme par LFPI mesuré en IRM en fonction du temps (Hayward et al.)</i>	<i>p.148</i>
<i>Figure 49 : CBF (mL/100g/mn) au niveau de la zone lésionnelle. (*p<0,05 SHAM vs TC Placebo ; # p<0,05 SHAM vs TC NIII)</i>	<i>p.150</i>
<i>Figure 50 : CBF (mL/100g/mn) au niveau de la zone controlatérale. (*p<0,05 SHAM vs TC Placebo ; # p<0,05 SHAM vs TC NIII)</i>	<i>p.150</i>
<i>Figure 51 : CBF (mL/100g/mn) au niveau de l'hippocampe homolatéral. (*p<0,05 SHAM vs TC Placebo ; # p<0,05 SHAM vs TC NIII)</i>	<i>p.151</i>
<i>Figure 52 : CBF (mL/100g/mn) au niveau de l'hippocampe controlatéral. (*p<0,05 SHAM vs TC Placebo ; # p<0,05 SHAM vs TC NIII)</i>	<i>p.151</i>
<i>Figure 53: Effet du MLC901 sur la neurogenèse obtenu par Marquage BrDU à J7 et J21 post-trauma</i>	<i>p.155</i>
<i>Figure 54: Vue en microscopie confocale du double marquage BrDU- fluorogold montrant la projection des axones des nouveaux neurones formés à la région CA3 de l'hippocampe (flèches).</i>	<i>p.155</i>
<i>Figure 55 : Western Blot of VEGF au niveau de l'hippocampe et du cortex dans le groupe Placebo et MLC901</i>	<i>p.156</i>
<i>Figure 56 : Tests comportementaux</i>	<i>p.158</i>
<i>Figure 57: Nombre d'erreurs en fonction de la distance parcourue J+1 et J+7</i>	<i>p.160</i>
<i>Figure 58 : Temps passé dans les différents quadrants selon le groupe de rat à J21 et J28</i>	<i>p.163</i>
<i>Figure 59: Protocole utilisé pour la reconnaissance d'objet</i>	<i>p.168</i>
<i>Figure 60 : Activité exploratoire (moyenne±SEM)</i>	<i>p.168</i>
<i>Figure 61: Mémorisation temporelle et spatiale (## vs hazard p<0,01; # vs hazard p<0,05 §vs Vehicle TBI)</i>	<i>p.169</i>

LISTE DES TABLEAUX

Table 1 : Principales études cliniques sur le MLC601 (Siddiqui et al.)	p.71
Tableau 2: Comparaison des 2 groupes de patients Placebo et NeuroAid	p.78
Tableau 3: Mortalité et LFPI (Dixon et al., 1988)	p.130

ABBREVIATIONS

MTC : Médecine Traditionnelle Chinoise
ACR : Arret cardiocirculatoire
AVC : Accident vasculaire cérébral
TC : Traumatisme crânien
ATP : adénosine-5'-triphosphate
NMDA : acide N -méthyl-D-aspartique
AMPA : -amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
PLA- 2 : Phospholipase A 2
MPTP : Mitochondrial Permeability Transition Pore
TAI : Traumatic Axonal Injury
CCL: Chemokines ligands
DAMPs : damage-associated molecular patterns
BHE: Barriere hémato encéphalique
t-PA: Tissue Plasminogen Activator
AQP: Aquaporine
NFkB: nuclear factor-kappa B
MAP: Mitogen Activated Protein
NKCC: Na-K-Cl cotransporter
GABA : acide γ -aminobutyrique
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule
VEGF : Vascular endothelial growth factor
ECM : matrice extra membranaire
MSC : Bone Marrow Stromal Cells
GOS : Glasgow Outcome Scale
EPO : Erythropoietine
rhEPO : Recombinant Erythropoietine
TB4 : Thyrosine beta 4
FGF : Fibroblast Growth Factor
ApoE : Apolipoprotéine E
TMS : Stimulation magnétique cérébrale transcranienne
BI : Barthel Index
DTER : Diagnostic therapeutetic effect

NIHSS : National Institute of Health Stroke Score

MMS: Mini Mental State

TUNEL Terminal Deoxynucleotidyl Transferase d'UTP Nick and Labeling

DAB: Diaminobenzidine

MDA: Malone dialdehyde

LFPI: Lateral Fluid Percussion

TTC: 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

PS 100: Protein S 100

NSE: Neuro specific enolase

CBF: Cerebral Blood Flow

ROI: Region of interest

ASL: Arterial spin labelling

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

BDNF: Brain Derived Neutrophic Factor

MLC 901= NIII=NeuroAid®

AVANT PROPOS

« Madame, asseyez-vous. Je suis médecin..., je m'occupe de votre mari. Il vient d'être admis dans notre service de réanimation, car il a présenté un arrêt cardio circulatoire. Son cœur s'est arrêté, mais a pu être « réactivé » au bout de 10 minutes d'un massage cardiaque externe. Le problème n'est plus actuellement le cœur mais son cerveau. Il a été privé d'oxygène pendant un certain temps, et vous le savez les neurones sont très sensibles au manque d'oxygène et meurent rapidement. Le risque de séquelles neurologiques est donc important. Nous pourrions évaluer l'importance de ces lésions dès que nous arrêterons les médicaments anesthésiques qui le maintiennent sous « coma artificiel ». Prévenez le reste de la famille, car nous sommes dans une situation grave»...

Ces paroles dites aux familles, je les ai entendues au cours de mes études, je les ai entendues de mes collègues, et je les ai formulées moi-même, avec cette sensation de résignation et d'impuissance devant ces mécanismes lésionnels induits par une ischémie, ou un traumatisme, au niveau de ce complexe et formidable organe qu'est notre cerveau.

La réflexion sur la neuroprotection ne date pas d'hier, souvent motivée par l'important impact médico-économique engendré. Pourtant nous n'avons pas encore trouvé aujourd'hui le « produit miracle » qui nous permettrait d'être plus confiant sur le devenir de ces malades. Beaucoup d'espoirs expérimentaux en termes de neuroprotection se sont envolés malheureusement lors de l'application à l'humain. La question que l'on pourrait alors se poser et à laquelle nous essaierons de répondre dans ce travail pourrait être : « Doit-on franchir les limites de notre pharmacopée pour trouver des solutions ?... ». Loin de notre médecine occidentale, la Médecine Traditionnelle Chinoise (MTC), qualifiée d' « ethnomédecine », a longtemps été stigmatisée. Cependant celle-ci s'est soumise à une loi d'analyse stricte

avec des publications maintenant de plus en plus fréquentes dans la littérature scientifique et médicale, suscitant ainsi la curiosité. La caractéristique de cette MTC repose sur une riche expérience médicale avec des résultats cliniques reconnus sur de grandes populations, mais sans base mécanistique solide. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'action neuroprotectrice et neurorégénérative du MLC901, produit dérivé de la MTC, sur les lésions cérébrales induites au cours de 2 modèles expérimentaux : ischémie globale et traumatisme crânien par percussion liquidienne latérale. Ce travail fait suite aux travaux cliniques rapportés dans la littérature, faisant part de l'effet bénéfique de ce produit sur le devenir des patients particulièrement dans le cadre des accidents vasculaires cérébraux. Une meilleure compréhension de l'action de ce composé est essentielle à son acceptation par notre médecine occidentale basée sur les preuves.

LE CEREBROLESE UN ENJEU MEDICO ECONOMIQUE

Sous le terme "cérébrolésé" sont regroupés les patients présentant une atteinte aiguë du système nerveux central qui met en jeu outre le pronostic vital, le pronostic fonctionnel avec des séquelles induisant des handicaps psycho-sensori-moteurs d'intensité variée. Les groupes pathologiques pourvoyeurs de la majorité des patients cérébrolésés sont les Accidents Vasculaires Cérébraux (AVC), l'arrêt cardio-circulatoire (ACR), et les Traumatismes Crâniens (TC). Bien que les mécanismes physiopathologiques aient peu de points communs, les trajectoires de soins des malades cérébrolésés sont très proches en termes d'organisation des filières de prise en charge, d'interventions et nécessitent une coordination des actions au sein d'un réseau formalisé entre les champs sanitaire et médico-social.

L'arrêt cardio-circulatoire

Ces dernières années, de grands progrès ont été accomplis dans l'identification des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Des programmes de prévention couronnés de succès ont démontré que la modification de ceux-ci permet de réduire leur mortalité et leur morbidité. Cependant, en dépit de ces interventions nombreuses, elles demeurent la principale cause de mortalité en France, à l'origine de près de 170 000 décès chaque année (32% des décès). Elles constituent en outre la troisième cause de décès prématurés, après les tumeurs et les morts violentes, et la première cause d'invalidité. Elles ont par conséquent d'importantes répercussions sur l'économie française, représentant 7.3 milliards d'euros, soit 17% des coûts directs de toutes les maladies. L'arrêt cardio-circulatoire (ACR) représente une des complications extrêmes de ces maladies cardiovasculaires, avec une incidence évaluée à 350 000 morts subites/an aux Etats Unis (Dumas and Cariou, 2014). Les causes d'ACR sont représentées en 3 groupes : causes hypoxiques, cardiaques, et traumatiques. Malgré des progrès récents, en particulier au cours de la prise en charge initiale (rapidité de mise en place de la réanimation cardio-circulatoire, éducation de la

population, disponibilité des défibrillateurs semi automatiques dans les lieux publics,...), sa mortalité globale reste élevée et est estimée à 70%. En moyenne 1 patient sur 10 arrive vivant à l'hôpital, les décès observés alors en phase hospitalière sont secondaires à différents phénomènes. Très précocement, le syndrome post-arrêt cardiaque, qui correspond à un choc mixte cardiogénique et vasoplégique, survient dans les heures qui suivent l'arrêt cardiaque et peut entraîner un décès précoce par défaillance multiviscérale (Laurent et al., 2002). Au-delà de cette première phase, les lésions neurologiques anoxo-ischémiques entraînent la majorité des décès tardifs, ainsi que les déficits que l'on retrouvera chez 40% des patients sortants vivants de l'hôpital.

Les déficits post-arrêt cardiaques peuvent être évalués par l'utilisation du score Cerebral Performance Category (CPC), développé par l'équipe de P. Safar dans les années 1980 (Edgren et al., 1994). Ce score s'étend d'un grade 1 où le patient ne présente pas de déficit neurologique à un stade 5 où le patient est en mort encéphalique.

CPC 1 : bonne performance cérébrale

CPC 2 : Déficit modéré

CPC 3 : Déficit sévère

CPC 4 : Etat végétatif

CPC 5 : Mort encéphalique

Bien que l'hypothermie thérapeutique ait fait progresser la récupération neurologique, le pronostic des patients en post ACR reste sombre (Dumas and Cariou, 2014). Les patients survivants à un ACR, présentent dans 70% des cas un score de CPC à 1-2 à leur sortie de l'hôpital. Pour ceux présentant des séquelles à la sortie de l'hôpital, ce score peut progresser au cours de l'année qui suit. On décrit une amélioration du CPC de 2 à 1 dans 75% des cas, de 3 à

2 dans 25% des cas et de 3 à 1 dans 4% des cas (Graves et al., 1997). La qualité de vie évaluée par la dépendance des patients est altérée chez 1 patient sur 5 (Rosen et al., 2001). La reprise d'activité, est possible pour un patient sur 3 à 6 mois, et pour 1 patient sur 6 à 1 an. L'activité à temps complet n'est possible que pour 46% des patients ayant pu reprendre une activité à 18 mois (Sauve, 1995). Les troubles de la mémoire représentent une plainte fréquente en post-ACR, 71% des patients présentant une altération modérée à sévère de celle-ci. Des évaluations plus précises utilisant le Mini Mental Test (MMS), retrouvent des déficits neurologiques dans 35% des cas à 2 ans (Lundgren-Nilsson et al., 2005). En ce qui concerne les troubles affectifs, 69% des patients présentent un profil dépressif 1 an après l'ACR (Roine et al., 1993). Ces troubles se corrigent lentement avec le temps. Le syndrome de stress post-traumatique (PTSD) est également retrouvé dans 19% des cas (O'Reilly et al., 2004).

Le traumatisme crânien

Il est également pourvoyeur d'un nombre important de patients « cérébrolésés ». On dénombre aux Etats Unis une incidence de 108-335 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an (Abelson-Mitchell, 2008; Rajasekaran et al.), constituant la deuxième cause de décès derrière les AVC (Hirtz et al., 2007). En France il serait de l'ordre de 150 000 nouveaux cas par an. Trente neuf pourcent des patients décèdent de leur traumatisme et 60% présentent des séquelles sévères. La mortalité liée au traumatisme est importante et les patients décèdent 2 à 3 fois plus que dans une population témoin. Soixante quinze pourcent des décès surviennent au cours de la première année post-trauma, cette mortalité est 10 fois supérieure à celle d'une population témoin appariée sur l'âge, le sexe et le niveau social. Ce fléau a une incidence qui augmente dans les pays en voie de développement (Maas et al., 2008) mais a tendance à diminuer dans les pays industrialisés du fait d'une évolution dans la prise en charge des patients ayant été victimes d'un

traumatisme crânien bénin (Thurman and Guerrero, 1999), mais également du fait d'une politique de répression conduisant à une diminution significative du nombre d'accidents de la route. En effet, selon les chiffres de la sécurité routière française, 3 250 personnes ont été tuées sur la route en France en 2013 contre 3 963 en 2011, soit une baisse de 18% de mortalité. La population touchée est souvent jeune avec des conséquences en termes de Santé Publique importantes. Le coût relié à ce traumatisme a été estimé aux USA à 396 331 \$ comprenant 330 827 \$ de perte de production et 65 504 \$ de coûts en soins (Faul et al., 2007). Cependant, les résultats des études s'étant intéressées à l'implication économique du traumatisme crânien sont très hétérogènes aussi bien en terme de recrutement (sévérité du traumatisme, procédure de prise en charge,...) qu'en terme d'outils d'évaluation (coûts directs, coûts indirects,...) rendant l'analyse financière difficile (Humphreys et al., 2013). L'amélioration du pronostic concernant ces patients dépend de l'importance du traumatisme mais également de la prise en charge initiale de ce genre de patients. Il a été clairement mis en évidence qu'une prise en charge adaptée par des équipes entraînées et bénéficiant d'un plateau technique dédié améliorerait le pronostic de récupération, permettant une diminution de la mortalité d'un facteur 3 (Gabbe et al., 2011).

Les séquelles post-traumatiques peuvent être importantes :

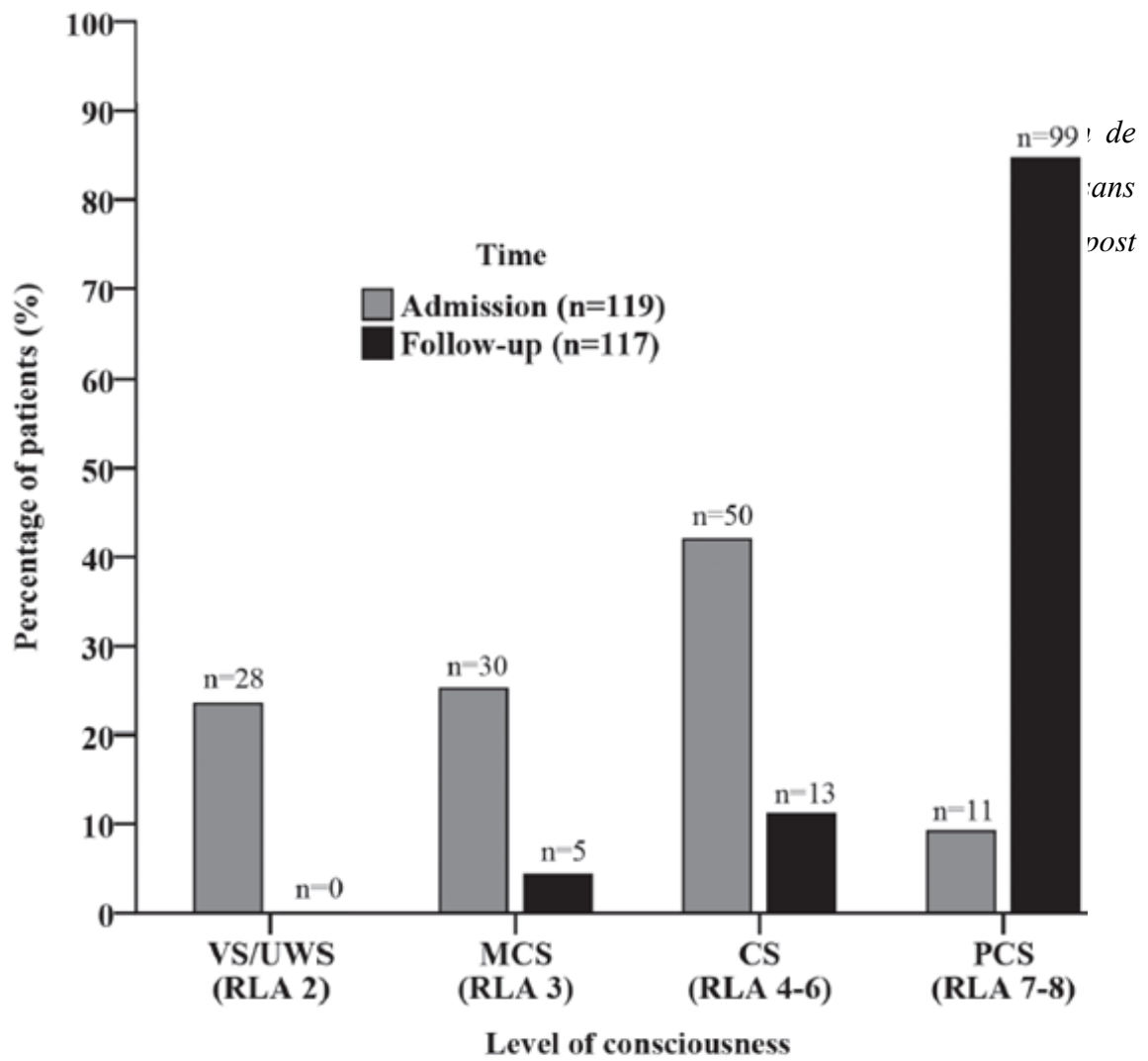
-*Epilepsie* : son incidence varie entre 2-66% selon la gravité du trauma (Beghi, 2003; Bratton et al., 2007b). Le risque épileptique est multiplié par un facteur 30 en post-traumatisme (Lowenstein, 2009).

-*Déficit sensitivo moteur* : varie de 0-100% en fonction de la gravité.

-Troubles cognitifs : 1 patient sur 3 présente une amnésie des faits. Cinquante pourcent après TC mineur ou modéré et 76% après TC grave présentent des troubles de la mémoire ou de l'humeur (Salmond and Sahakian, 2005). Ces troubles cognitifs évoluent avec le temps. En effet, dans une étude de 119 traumatisés crâniens graves, Sommer et al. (Sommer et al. , 2013) décrivent une progression du pronostic neurologique au cours de la première année post-trauma. Ils observent une diminution du nombre de patients en état végétatif avec un développement des états post-confusionnels (Figure 1).

-Syndrome douloureux : Le syndrome post commotionnel dominé par des céphalées, troubles du sommeil, fatigue, trouble de l'équilibre, avec irritabilité et anxiété s'amende avec le temps (Bryant and Harvey, 1999). Les douleurs chroniques à type de céphalées chroniques se retrouvent surtout lors de TC mineurs (75%).

-Troubles psychiatriques: La dépression touche 20-25% des TC graves, avec un risque suicidaire multiplié par 4 par rapport à une population témoin (Engberg and Teasdale, 2004). L'anxiété est retrouvée chez 70% des TC (Moore et al., 2006) soit 2 fois plus que dans la population générale. Le syndrome de stress post traumatique (PTSD) est retrouvé chez 39% des patients ayant présenté un traumatisme (Koren et al., 1999).



L'ensemble de ces données, chez les patients présentant un ACR ou un TC, nous confirme que les séquelles cérébrales sont lourdes et associées à des conséquences économiques importantes. Cette analyse doit nous conduire à réfléchir à des démarches d'optimisation de la prise en charge de ces patients « cérébrolésés » potentiels afin d'améliorer leur pronostic et d'en limiter les séquelles fonctionnelles. A l'instar du « programme d'action en faveur des traumatisés crâniens et médullaires » développé en 2012 par le Ministère de l'Emploi et du Travail, du Secrétariat à la Santé, et du Ministère de la Solidarité et de la Cohésion Sociale (Travail et al., 2012), cette prise en charge doit tourner autour de 3 axes :

- Axe A - Prévenir et protéger
- Axe B - Généraliser les dispositifs propres à assurer la qualité, la pertinence, la continuité et la sécurité des soins des prises en charge et de l'accompagnement
- Axe C - Sécuriser le retour et le maintien en milieu de vie ordinaire

On comprend donc bien que le pronostic neurologique fonctionnel dépend d'une prise en charge pluridisciplinaire permettant au bout de la chaîne d'améliorer le devenir du « cérébroléé ».

En tant que médecins anesthésistes réanimateurs, nous prenons en charge les patients à la phase aigüe de leur ACR ou TC. Premier maillon de la chaîne, nous nous inscrivons dans l'axe B, et il est donc de notre devoir d'essayer d'optimiser cette étape dans cette démarche de qualité qui nous est dictée. La première étape de cette amélioration de prise en charge nécessite une connaissance précise des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la souffrance neuronale induite par l'ischémie-reperfusion suite à l'ACR ou par le traumatisme afin de proposer l'ensemble des thérapeutiques permettant de

limiter l'extension des lésions, mais également de promouvoir les mécanismes de restauration et de plasticité qui peuvent se développer au décours. Nous décrirons donc dans la suite de ce travail, les mécanismes induits dans la souffrance cellulaire post- ACR et TC, avant de discuter de l'ensemble des moyens neuroprotecteurs et neurorégénérateurs disponibles actuellement.

A noter : L'AVC est également une source importante de patients cérébrolésés, mais nous n'aborderons pas ce sujet volontairement dans cet exposé, où nous nous focaliserons essentiellement sur les 2 pathologies sus citées (TC et ACR) responsables d'un recrutement important dans nos unités de réanimation.

**MECANISMES PHYSIOPATHOLOGIQUES
INDUITS PAR L'ACR ET LE TRAUMATISME
CRANIEN**

L 'arrêt cardio-circulatoire

L'interruption brutale et suffisamment prolongée du débit sanguin, suite à un ACR, dans l'ensemble du territoire vasculaire cérébral entraîne des lésions cérébrales consécutives à une déplétion énergétique et une hypoxie prolongée. Les mécanismes mis en jeu et leur décours temporel sont maintenant bien identifiés (Figures 2 et 3) (Dirnagl et al., 1999). La consommation cérébrale en oxygène au repos moyenne étant de 3-6 mL/100g/min, au bout de 20 secondes post-arrêt circulatoire le taux d'oxygène cérébral diminue. Le cerveau n'ayant aucune réserve en glucose, substrat principal du cerveau, on observe une diminution des réserves de glucose et d'ATP au bout de 4-6 mn d'interruption du flux sanguin. Une diminution du flux sanguin cérébral soit localement, soit globalement provoque donc une diminution de l'apport en glucose et oxygène qui conduit, au niveau cellulaire, au passage d'une respiration de type aérobie à un type anaérobie avec, secondairement, une diminution de la production d'ATP et une acidose lactique (Mattson and Mark, 1996). La diminution de l'ATP altère tout un ensemble de processus énergétiques cellulaires et entraîne finalement la mort cellulaire.

La Cascade nécrotique

L'ATPase sodium-potassium est une enzyme clé dont le fonctionnement est affecté par des concentrations basses ou nulles d'ATP. L'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP lui permet d'exporter trois ions sodium de la cellule en échange de deux ions potassium du milieu extracellulaire, ce mécanisme étant largement responsable du maintien du potentiel membranaire de repos de la membrane plasmique. Un effondrement du potentiel membranaire au niveau des terminaisons présynaptiques conduit à une dépolarisation membranaire et à l'activation des récepteurs présynaptiques des canaux calciques voltage-

sensibles. Alors que ces canaux ioniques sont normalement transitoirement activés, l'ischémie provoque une dépolarisation prolongée au niveau de la membrane plasmique qui permet une activation durable de ces canaux calciques voltage-sensibles et un influx important de calcium extracellulaire. L'élévation présynaptique de calcium intracellulaire, à son tour, provoque un relargage massif de glutamate au niveau de la fente synaptique. Cette libération excessive du glutamate, dite phase d'excitotoxicité, va activer les récepteurs glutamatergiques acide *N*-méthyl-D-aspartique (NMDA) et α -amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate (AMPA) aboutissant à l'augmentation de calcium dans la cellule et à la mort neuronale par nécrose ou apoptose (Lee et al., 2000a). Il existe, de plus, une anomalie du recaptage du glutamate durant l'ischémie (Lipton and Rosenberg, 1994). L'ischémie provoque aussi une dépolarisation de la membrane postsynaptique par l'intermédiaire d'une altération de la fonction de l'ATPase sodium-potassium et de l'activation des récepteurs AMPA. Cette dépolarisation facilite le relargage d'ions magnésium du récepteur NMDA et, en présence d'un excès de glutamate, les récepteurs NMDA activés induisent alors un influx de calcium extracellulaire. L'augmentation de calcium intracellulaire qui en résulte est par ailleurs accrue par l'action directe du glutamate sur ses récepteurs postsynaptiques qui activent la phospholipase C, ce qui provoque une hydrolyse des phospho-inositides et la production de diacylglycérol et d'inositol triphosphate (Nicoletti et al., 1996). L'augmentation de ce dernier provoque à son tour un relargage du calcium à partir des sites de stockage intracellulaires. En outre, le diacylglycérol active la protéine kinase C qui se lie et augmente l'activité des récepteurs NMDA, provoquant par voie de conséquence, une augmentation encore plus grande du calcium dans la cellule (Schoepp and Conn, 1993).

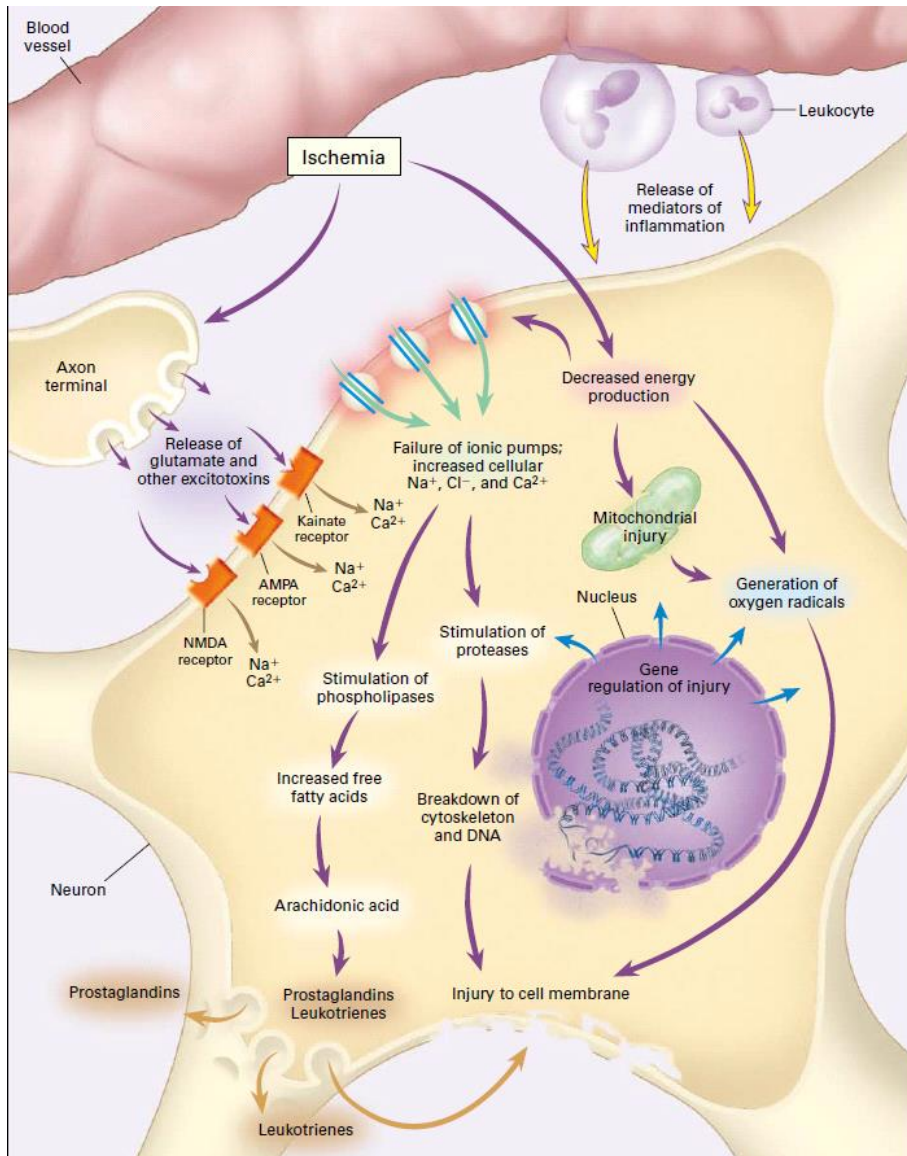


Figure 2: Mécanismes moléculaires induits par l'ischémie cérébrale (Brott and Bogousslavsky, 2000)

Il apparaît donc que tout un ensemble de mécanismes régulant le métabolisme du calcium est altéré durant l'ischémie, provoquant une élévation du calcium intracellulaire. Cette augmentation de calcium provoque directement ou indirectement l'activation d'un certain nombre d'enzymes, en particulier la phospholipase A2 (PLA2), la NO synthase, la xanthine oxydase, différentes kinases, des endonucléases, des lipases et des protéases. Ces activations enzymatique conduisent à la production de radicaux libres, à une altération des membranes plasmiques et des différents organelles, à un œdème cellulaire et à la mort neuronale (Kristian et al., 1996). Le *calcium et la calmoduline*, protéine s'associant aux ions calcium, activent la synthèse d'oxyde nitrique qui est ensuite converti en radical libre peroxy-nitrite. L'élévation du calcium intracellulaire active la *Phospholipase A2 (PLA2)* qui conduit à la production de lysophospholipides et d'acide arachidonique. L'excès de lysophospholipides provoque une dysfonction membranaire. *L'acide arachidonique*, quant à lui, est métabolisé par la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase, conduisant à la formation de prostaglandines, de leucotriènes et de thromboxane A2 qui altèrent la fonction membranaire. L'oxydation de l'acide arachidonique *via* la cyclo-oxygénase et la lipo-oxygénase provoque la formation de radicaux libres (RO, radicaux oxygènes) tels le O₂⁻, NO⁻, et H₂O₂ (Mattson and Mark, 1996), qui eux même sont responsables d'une altération des membranes et d'une dysfonction de l'environnement microvasculaire ou lésions de *stress oxydatif*. De manière intéressante, l'excès de *glutamate extracellulaire* altère l'entrée de cystine dans le cytoplasme. La cystine est un précurseur du glutathion, qui a un rôle protecteur vis-à-vis de la production de radicaux libres. Ainsi, l'augmentation de glutamate provoque une diminution des concentrations intracellulaires de glutathion, aggravant la production non contrôlée de radicaux libres. Les mitochondries sont particulièrement vulnérables à une élévation du calcium intracellulaire, car ces organelles sont capables de stocker de grandes quantités de calcium. L'augmentation du *calcium*

intramitochondrial provoque une diminution de la respiration mitochondriale, une activation de la *PLA2 mitochondriale* avec, là encore, la production de radicaux libres qui conduit à une altération de la perméabilité de la membrane mitochondriale à différents ions (Mattson and Mark, 1996). L'activation d'autres protéases calcium-dépendantes et de nucléases conduit à des altérations de la membrane cellulaire, du cytosquelette et des acides nucléiques, le tout conduisant à une mort cellulaire.

A coté de la mort cellulaire par nécrose induite par ces cascades dégénératives, *l'apoptose, ou mort cellulaire programmée*, apparait de manière plus lente et régulée. Chez le rat, une ischémie cérébrale globale transitoire provoque des phénomènes apoptotiques de manière relativement sélective au niveau de l'hippocampe et du striatum, qui s'aggravent lorsque l'ischémie est prolongée (MacManus et al., 1993). L'apoptose évolue selon différentes phases d'activation, de propagation, d'engagement et d'exécution. La phase d'exécution implique l'activation d'une famille de protéases appelées *caspases*. Ces protéines provoquent un clivage protéolytique spécifique dans les cellules présentant un phénotype apoptotique (Cohen, 1997). Les caspases sont normalement présentes dans le cytoplasme comme pro-enzymes "dormantes" et leur activité est modulée par un autre groupe de protéines de la famille Bcl-2. Quelques membres de cette famille favorisent l'apoptose (bax, bcl-xs, BAD) alors que d'autres l'inhibent (bcl-2, bcl-xL). Une élévation du calcium est peut être le principal facteur qui déclenche le programme de mort cellulaire retardée. Cependant l'augmentation de calcium semble nécessiter la présence d'oxygène pour accélérer l'apoptose, car une privation d'oxygène inhibe celle-ci même en présence de calcium (Dubinsky et al., 1995). C'est également ainsi que peuvent s'expliquer les dégâts induits lors de la reperfusion cellulaire.

D'autres mécanismes sont également impliqués dans cette souffrance cellulaire impliquant des voies inflammatoires (cytokines, interleukines, activation leucocytaire) (Tobin et al., 2014), le déséquilibre de la balance oxydante (augmentation du stress oxydant, diminution des défenses antioxydantes) (Lee et al., 2000b).

Enfin l'ensemble de ces mécanismes conduit également au développement d'un *oedème cytotoxique mais également vasogénique* par altération de la barrière hémato encéphalique (Figure 3) (Gasche and Copin, 2003). L'atteinte de la barrière hémato-encéphalique est secondaire à des mécanismes complexes faisant intervenir les radicaux libres, les métalloprotéases et les molécules d'adhésion (Gasche and Copin, 2003). Nous détaillerons cet aspect dans le chapitre suivant.

A la vue de ces différentes données, il apparaît que la souffrance ischémique post-arrêt circulatoire est un mécanisme complexe faisant intervenir différentes voies pouvant se suivre et se potentialiser dans le temps (Figure 4). L'ischémie est responsable des lésions très précoces en rapport avec la carence énergétique induite par l'hypoxie et la carence en glucose mais la reperfusion, plus tardive, crée d'autres lésions secondaires à l'activation d'autres voies, telles que l'activation de radicaux libres, l'apoptose,...

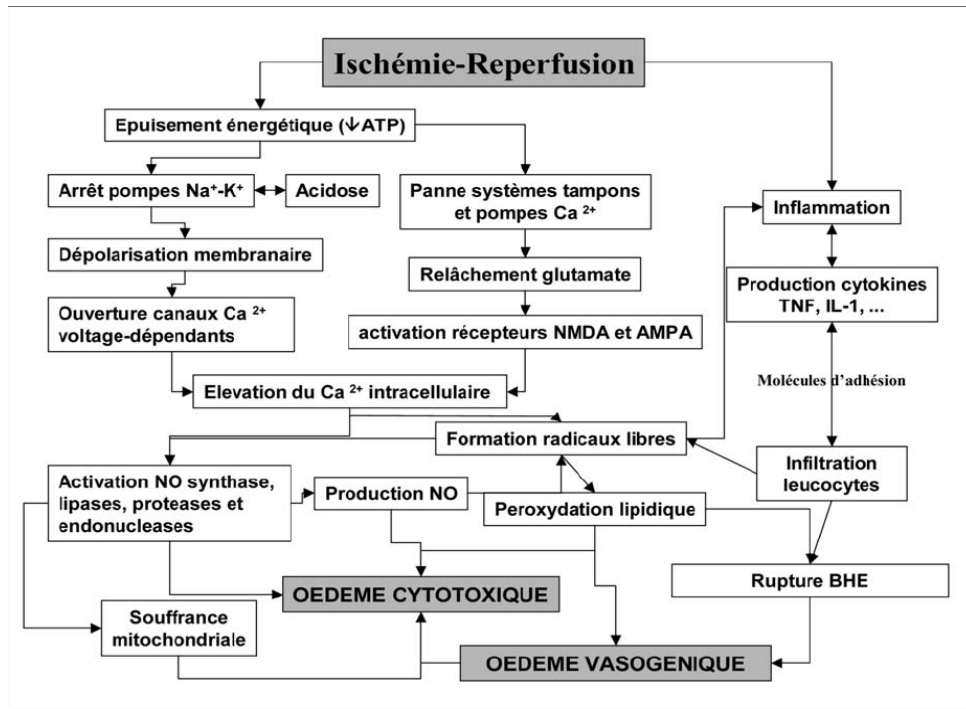


Figure 3: Cascades physiopathologiques mises en jeu en post-ischémie et conduisant à un oedème cytotoxique et vasogénique (Gasche and Copin, 2003)

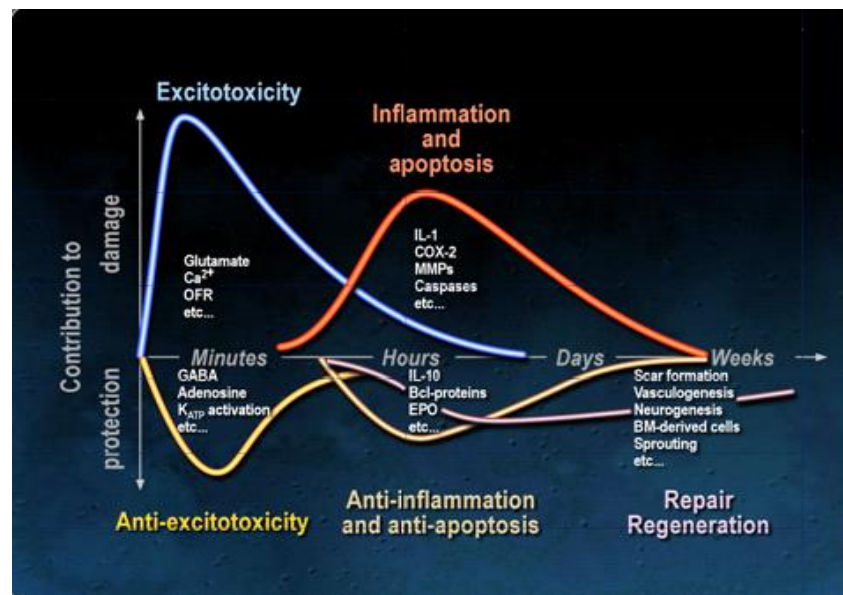


Figure 4: Déroulement temporel des mécanismes de souffrance et de protection neuronale suite à une ischémie (à partir de Dinargl, 2009)

Le traumatisme crânien

A la différence de l'ACR où les lésions ischémiques sont secondaires à un arrêt complet de la circulation cérébrale pendant un temps t , le traumatisme crânien est une entité complexe où le mécanisme lésionnel et l'intensité du traumatisme jouent un rôle majeur sur l'importance des lésions créées.

On distingue 2 grands mécanismes lésionnels dans les traumatismes crâniens :

- *Traumatisme crânien fermé :*

Celui-ci est secondaire à des forces statiques et dynamiques s'exerçant sur le cerveau. La composante dynamique, la plus fréquente, est secondaire à une accélération/décélération du cerveau. Cette accélération/décélération peut être due à un mouvement brutal (activation ou arrêt) générant une force d'inertie mais également à la transmission d'une énergie cinétique d'un objet sur la tête du patient. Ces mécanismes sont essentiels à comprendre afin de déterminer l'importance et l'étendue des lésions présentées. En effet, l'anatomie du cerveau le rend mobile à l'intérieur d'un contenant rigide inextensible, créant différents types de lésions, dont des lésions de coup et contre coup (Figure 5). Suite à un impact frontal, l'enregistrement des pressions intracérébrales révèle des variations importantes de pressions. Au niveau du coup, on assiste à une augmentation importante de la pression associée à une diminution et négativation de la pression au niveau de la zone de contre coup (Figure 6).

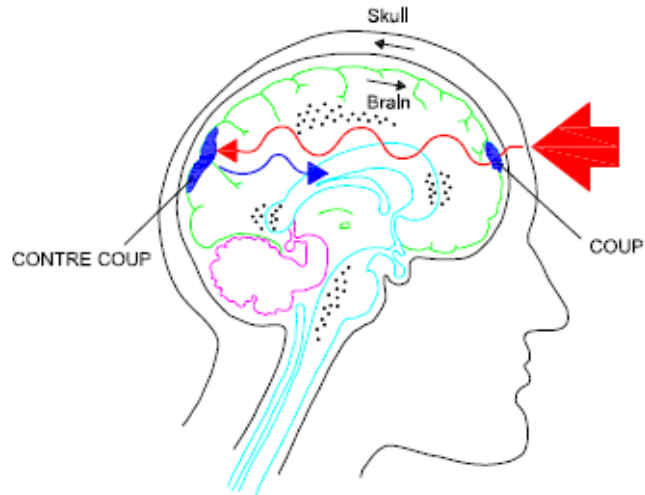


Figure 5: Transmission de l'onde traumatique intracérébrale (El Sayed et al., 2008)

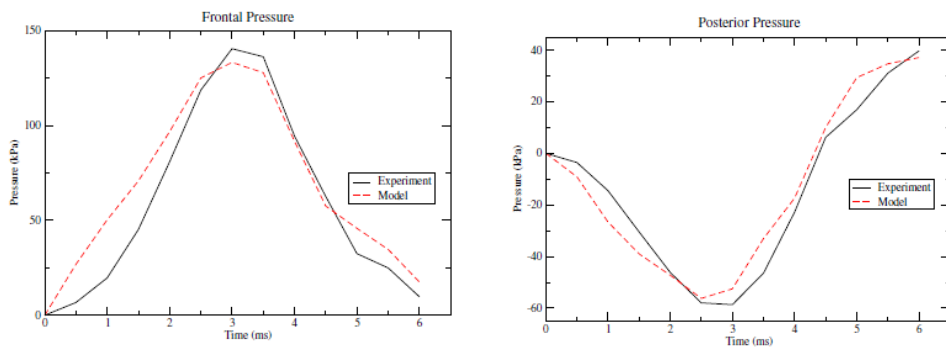
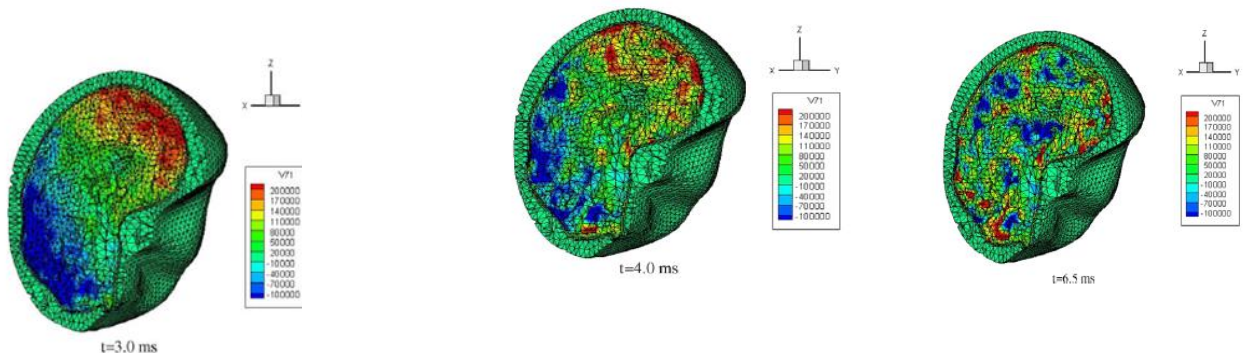
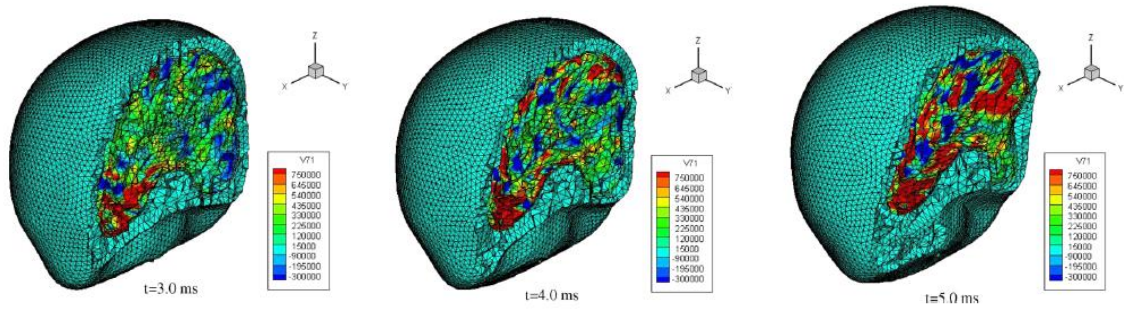


Fig 6: Onde de pression au niveau du coup (frontal) et du contre coup (postérieur) (El Sayed et al., 2008)

La négativation de pression, au-delà d'un seuil est associée à l'apparition de cavitation. Des lésions de cavitation sont également observées au niveau de la zone d'impact. Ces données ont été confirmées dans d'autres modèles. En effet dans une étude, s'intéressant aux contraintes biomécaniques lors des traumatismes crâniens, El Sayed and al. (El Sayed et al., 2008), ont développé un modèle mathématique de traumatisme crânien, permettant de décrire les contraintes induites par le traumatisme de 7 kN sur les différentes structures du cerveau. Après validation de leur modèle sur cadavre, ils ont simulé 2 types de traumatismes : un frontal et un latéral. En ce qui concerne le traumatisme frontal, ils confirment l'augmentation massive des pressions en zone frontale et la négativation des pressions en zone postérieure. En ce qui concerne le choc oblique, les pressions engendrées sont significativement plus importantes. En effet les pressions induites varient de 200 à -100 kN dans le choc frontal et de 750 à -300 kN dans le choc oblique. Des lésions de cisaillement sont également présentes et sont 10 fois plus élevées en cas de choc oblique qu'en cas de choc frontal (Figure 7). Ceci souligne une nouvelle fois l'importance du mécanisme lésionnel dans l'étendue de la lésion induite.



Impact frontal : Forces intracrâniennes induites en fonction du temps



Impact oblique : Forces intracrâniennes induites en fonction du temps

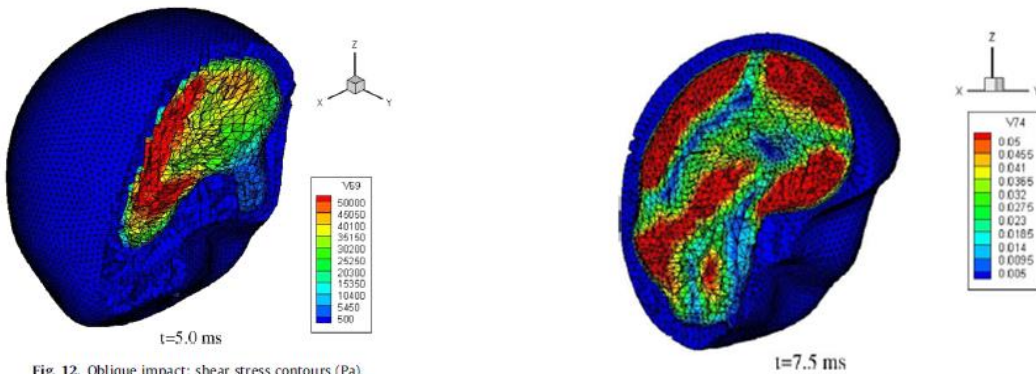


Fig. 12. Oblique impact: shear stress contours (Pa).

Fig. 8. Frontal impact: viscous shear deformation predictions.

Forces de cisaillement impact frontal et oblique en fonction du temps

Figure 7: Etude biomécanique des forces induites au niveau cérébral suite à un impact frontal ou latéral en fonction du temps (El Sayed et al., 2008).

- *Traumatisme crânien pénétrant*

L'importance des lésions induites dépend du poids, du volume, du trajet, et de la vitesse du matériel pénétrant la boîte crânienne. Nous ne détaillerons pas ce type de trauma du fait de la particularité lésionnelle induite par le type de projectile.

Les lésions induites lors d'un traumatisme crânien sont définies en *lésions primaires* par atteintes directes du parenchyme cérébral. Elles peuvent être focales (ex : Hématomes intracérébraux) ou diffuses. Dans ce cas, les lésions sont souvent dues à des lésions axonales traumatiques (Traumatic Axonal Injury, TAI) souvent à distance de la lésion initiale. Les TAI ont été associés au pronostic fonctionnel des patients.

Les *lésions secondaires* apparaissent, elles, dans les heures à journées suivant le traumatisme crânien. Celles-ci sont les plus accessibles à des thérapeutiques médicamenteuses. Nous aborderons dans la suite de cet exposé l'ensemble des mécanismes cellulaires induits par le traumatisme.

Mécanismes cellulaires induits par le traumatisme crânien.

- *Excitotoxicité et mort neuronale*

Suite à un traumatisme, comme dans l'ACR, on observe une augmentation du taux de glutamate cérébral (Faden et al., 1989). Ce glutamate va être responsable d'une activation de la phase d'excitotoxicité, que nous avons précédemment décrite et conduire à la mort neuronale. Comme précédemment la mort cellulaire post- traumatique peut être rattachée à 2 phénomènes, la nécrose et l'apoptose, qui dans le cas du modèle choisi dans notre étude (Lateral Fluid Percussion LFP) contribuent de manière équivalente à celle-ci. Cependant, des hypothèses sur un continuum entre les mécanismes apoptotiques et nécrotiques semble exister du fait de la présence concomitante de cellules nécrotiques et apoptotiques sur une même surface lésionnelle.

Nécrose cellulaire

Le traumatisme crânien conduit à une perte neuronale par nécrose au niveau du cortex, de l'hippocampe, du cervelet et du thalamus apparaissant au cours des premières 48h post-traumatiques. L'importance de cette perte neuronale a été mesurée, en particulier au niveau de l'hippocampe, et est proportionnelle à l'intensité du traumatisme réalisé en expérimental. En effet, Hellmich et al. (Hellmich et al., 2005), ont démontré au niveau du CA1, CA3, et DG, par une coloration Fluoro Jade, une augmentation significative du nombre de cellules lésées, suite à des traumatismes modérés et sévères par rapport à un traumatisme mineur. L'extension des lésions concerne l'hémisphère atteint mais également s'étend en controlatéral, avec des lésions hippocampiques controlatérales observées dès 48h après le traumatisme.

Dans les minutes qui suivent le traumatisme, la dégénérescence neuronale est en rapport avec des mécanismes nécrotiques, avec apparition d'une

ballonisation cellulaire et mitochondriale, une vacuolisation du cytoplasme et une augmentation du calcium intracellulaire (Patel et al., 2012; Raghupathi, 2004).

Apoptose

Ce mécanisme de mort cellulaire programmée a été observé également dans le cadre du traumatisme crânien. Les lésions sont essentiellement situées au niveau du cortex et de l'hippocampe. Ces dernières ont une évolution selon une cinétique particulière, puisque l'on observe une augmentation biphasique du nombre de cellules apoptotiques, marquées par une coloration TUNEL, dans les 24h, puis au bout d'une semaine post-trauma, au niveau du cortex. Au niveau du thalamus, des cellules en apoptose apparaissent au-delà de la première semaine. Les caspases et les inhibiteurs de caspase semblent être au centre de ce mécanisme de mort cellulaire (Raghupathi et al., 2000) (Keane et al., 2001).

- *Perturbations vasculaires et métaboliques*

A côté de ces mécanismes, on observe par technique de tomographie par émission de positron (PET scan) des lésions ischémiques, par diminution du débit et augmentation de l'extraction en O₂, qui peuvent être secondaires directement aux lésions induites par le traumatisme au niveau de la barrière hématoencéphalique, mais également à des épisodes de vasospasmes (Coles et al., 2004). On assiste aussi à un "découplage" métabolique associant une diminution du débit sanguin cérébral à une augmentation du métabolisme du glucose (Ginsberg et al., 1997). Nous détaillerons plus loin les variations de débit sanguin cérébral mesurées au cours du temps chez les traumatisés crâniens.

- *L'Inflammation post traumatique*

Le relargage massif de glutamate conduit également à des lésions au niveau de la barrière hématoencéphalique, la rendant perméable. Les radicaux libres libérés lors de cette période en sont en grande partie responsable. Cette perméabilité permet le passage dans les 2 sens, des cellules et molécules inflammatoires. Cette inflammation peut prendre différentes formes. Les chemokines inflammatoires sont sécrétées par la glie et les macrophages activés. Les principales identifiées sont les chemokines ligands CCL2, CCL20, CCL21. Différentes cytokines ont été identifiées, pouvant avoir des rôles très différents en post-traumatisme, interleukines 1, 6, 8, 10. Leur sécrétion peut être étalée dans le temps par la microglie qui joue un rôle central dans ce contexte. En effet celle-ci sécrète du $TNF\alpha$. On peut distinguer deux sous types de microglie M1 sécrétant des taux importants de $TNF\alpha$, IL1 et M2 sécrétant des taux faibles de $TNF\alpha$, mais des taux importants d'IL 10. Il semble que le type de microglie activée par le trauma puisse avoir un impact direct sur l'aggravation des lésions avec un type M1 favorisant le développement des lésions et un type 2 facilitant les mécanismes de régénération (Loane et al., 2010).

En parallèle vient s'associer une augmentation systémique de la réponse inflammatoire par l'intermédiaire des cytokines, chemokines, et damage-associated molecular patterns (DAMPs), potentiellement stimulée par la réaction sympathique due au traumatisme et conduisant à une infiltration cellulaire au niveau du cerveau (Namas et al., 2009).

- *L'autophagie*

L'autophagie est un autre processus dynamique et hautement régulé d' "entretien " des protéines, lipides et composés âgés de la cellule (Smith et al., 2011). Ce mécanisme de recyclage intracellulaire est essentiel à la cellule en cas de privation énergétique. La description de ce mécanisme est

controversée *in vivo*, cependant différentes études ont démontré sa présence en condition pathologique. La première description en traumatologie a été faite par Diskin en 2005, montrant une régulation accrue de la protéine régulant l'autophagie Beclin-1 (Diskin et al., 2005). Les autophagosomes apparaissent dans les 2 à 48h suivant le traumatisme. Le rôle de ce mécanisme n'est pas encore clairement élucidé dans le traumatisme crânien. Des travaux régulant l'activité oxydante inductrice d'autophagie, démontrent une amélioration des tests psychomoteurs dans la piscine de Morris (Smith et al., 2011).

- *L'œdème cérébral*

Ces différents mécanismes conduisent, comme dans l'ischémie, au développement d'une infiltration œdémateuse cellulaire et extracellulaire.

Depuis les travaux de Klatzo en 1967, l'œdème cérébral observé au cours du traumatisme peut être défini en 4 formes (Klatzo, 1967) :

- *L'œdème hydrostatique et l'œdème osmotique*

L'œdème hydrostatique résulte d'une augmentation de pression hydrostatique, comme on l'observe dans les hydrocéphalies ou les élévations de pression hydrostatique vasculaire au-delà du seuil d'autorégulation cérébrale (encéphalopathie hypertensive). L'œdème osmotique résulte lui d'un déséquilibre de pression osmotique entre secteur intracellulaire-extracellulaire et vasculaire du cerveau. Il survient en cas de baisse de l'osmolalité plasmatique (hyponatrémie hypotonique avec encéphalopathie hyponatrémique) ou d'augmentation de l'osmolalité cérébrale (ischémie cérébrale). Néanmoins, le cerveau possède des moyens de régulation de son volume face à de telles variations d'osmolalité : c'est l'osmorégulation cérébrale. Les cellules cérébrales régulent leur volume malgré la persistance de valeurs anormales de tonicité plasmatique (Sterns and Silver, 2006) (Marmarou et al., 2006). En cas d'hypotonie plasmatique, après une augmentation transitoire, le volume cellulaire va décroître rapidement : c'est le mécanisme de régulation par

diminution de volume ou "regulatory volume decrease" (RVD). En cas d'hypertonie plasmatique c'est le mécanisme inverse de "regulatory volume increase" (RVI). Ce phénomène fait appel à des modifications du contenu intracellulaire en substance osmotiques actives.

-L'œdème vasogénique :

L'œdème vasogénique est la conséquence d'une altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE). La BHE normale représente l'interface sang/cerveau. Sur un plan anatomique, elle est constituée des cellules endothéliales capillaires qui sont recouvertes et donc au contact direct des pieds astrocytaires. Ces cellules endothéliales capillaires sont assemblées entre-elles de façon étroite par des zones de jonctions ("tight junctions"), qui assurent une étanchéité sélective et un contrôle total des échanges liquidiens et moléculaires entre les vaisseaux et le cerveau. La perméabilité de la BHE aux différentes substances est conditionnée par leur poids moléculaire, leur forme et leur liposolubilité. Ainsi, les petites molécules liposolubles passent librement la BHE, alors que les grosses molécules hydrosolubles ne peuvent pas diffuser librement, de sorte que leur passage nécessite des systèmes de transport ou des canaux spécifiques. Lorsque la BHE est intègre, les échanges hydriques répondent à la loi de Starling modifiée, c'est à dire qu'ils dépendent des gradients de pression hydrostatique, oncotique et osmotique transmembranaire. Ainsi, plus la pression hydrostatique capillaire augmente, plus l'eau traverse la BHE des vaisseaux vers le cerveau. Le coefficient de réflexion des protéines et des ions est égal à 1, ce qui témoigne de l'imperméabilité de la BHE à ces substances. Toute baisse de pression osmotique ou oncotique vasculaire favorise donc le transfert d'eau du secteur vasculaire vers le cerveau, quand la BHE est intacte. Lorsque la BHE est lésée, l'atteinte des cellules endothéliales capillaires aboutit à une ouverture des jonctions étroites avec accumulation d'eau, d'électrolytes et de protéines (exsudat) dans le secteur interstitiel cérébral en provenance des capillaires. Ces lésions de la BHE peuvent être secondaires

à des lésions mécaniques (lors du traumatisme) et/ou à des phénomènes inflammatoires. Le t-PA (tissu plasminogène activateur), anticoagulant naturel, est augmenté en post-traumatique de 30% entre la 1^{ère} et la 3^{ème} heure post-trauma et revient à la normale dans les 24h (Sashindranath et al., 2012). L'association à son inhibiteur PAI-1 permet l'activation d'une métalloprotéinase (MMP3) jouant un rôle dans cette perméabilité vasculaire, puisque son inhibition reverse la perméabilité post-trauma (Sashindranath et al., 2012). Dans ces situations, le contrôle des échanges hydriques et moléculaires par la BHE n'existe plus. Ceci explique la nécessité de ne pas administrer de solutés hypotoniques et de contrôler la pression de perfusion dans ces situations. La perméabilité membranaire vasculaire post-traumatique contribue à l'augmentation de la mortalité et morbidité post-traumatique.

-L'œdème cellulaire :

L'œdème cellulaire se caractérise par une accumulation d'eau dans les cellules cérébrales (neurones, astrocytes, cellules gliales et endothéliales), préférentiellement dans la substance blanche, du fait de la disposition des fibres par rapport à la substance grise. Cet œdème est dû essentiellement à un déficit énergétique avec dysfonctionnement de la pompe Na/K/ATPase ou anomalie de perméabilité membranaire conduisant à un enrichissement de la cellule en substances osmotiques. Il apparaît rapidement en 30 min et prédomine au niveau astrocytaire. Il est constitué d'eau et d'électrolytes, mais est dépourvu de protéines.

En post-traumatisme, l'astrocyte est la principale cellule impliquée dans ce mécanisme, elle est la première cellule à être ballonnée par l'œdème (Dodson et al., 1977) (Jayakumar et al., 2008). Les dendrites des neurones peuvent être également touchées par ce mécanisme. L'astrocyte est essentiel au fonctionnement du système nerveux central, il capte le glutamate, permet le transport d'eau, et participe au pouvoir tampon intracérébral. Il participe également à la récupération neuronale post-traumatique. L'œdème astrocytaire

est secondaire à la capture du K^+ , Cl^- et Na^+ associée à des mouvements d'eau (Su et al., 2002), et à la dysfonction de la pompe Na^+/K ATPase. Les travaux de Venero (Venero et al., 2001) ont mis en évidence que des protéines membranaires impliquées dans le transport d'eau jouaient un rôle essentiel dans l'œdème astrocytaire : les aquaporines (Badaut et al., 2011). On distingue actuellement 10 sous types d'aquaporines. L'AQP 9 a la particularité d'être perméable à l'eau mais également à d'autres petites molécules, tel que le lactate (Tsukaguchi et al., 1999). L'AQP 4 est exprimée, de manière importante, au niveau du pied astrocytaire péricapillaire et pourrait jouer un rôle important dans l'œdème cellulaire (Manley et al., 2000; Rash et al., 1998; Yang et al., 2008) (Badaut et al., 2011). On observe une augmentation de l'expression de cette protéine membranaire dans les suites du traumatisme crânien par percussion latérale (Rao et al., 2011). Cette apparition est rapide, dans l'heure qui suit le traumatisme, avec un pic à la 3^{ème} heure (Figure 8).

La régulation de l'AQP 4 semble dépendre de plusieurs mécanismes :

- L'activation du stress oxydant semble être un facteur déclenchant. L'utilisation d'antioxydant semble diminuer la présence d'AQP 4 au niveau de la membrane astrocytaire (Rao et al., 2011).
- Le stress oxydant et l'inflammation favorisent l'activation du nuclear factor-kappa B (NF kB). L'utilisation d'antagonistes de NF kB est associée à une diminution de l'œdème cellulaire (Jayakumar et al., 2014).
- L'activation des Mitogen Activated Protein (MAP) kinases, par l'intermédiaire du stress oxydant semble également être associé au développement de l'œdème cellulaire (Jayakumar et al., 2006). L'inhibition de ces MAPk par des inhibiteurs est associée à une diminution de l'expression d'AQP 4 (Rao et al., 2011).

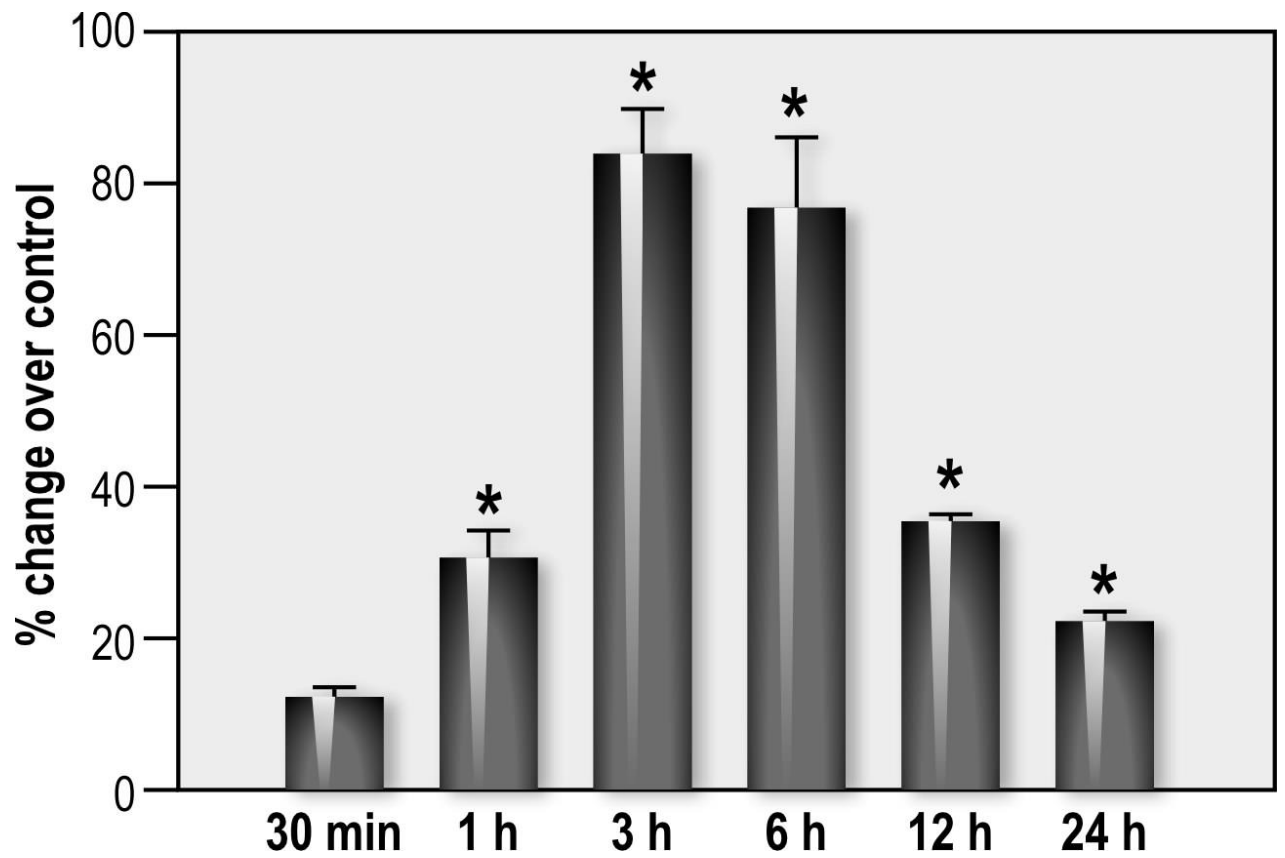


Figure 8: Expression AQP4 au cours du temps en post- trauma (* $p < 0,05$ vs 30min) (Rao et al., 2011).

- La perméabilité membranaire mitochondriale induite par l'afflux de Ca^{2+} favorise le développement de l'œdème cellulaire (Jayakumar et al., 2008).
- L'utilisation de cyclosporine A, bloquant ce mécanisme est associée à une diminution d'expression d'AQP 4 (Rao et al., 2011).
- Na-K-Cl cotransporteur (NKCC) est un transporteur impliqué dans le transport Na^+/K^+ couplé au Cl^- . On observe une augmentation de son expression dans les suites d'un traumatisme avec une implication sur l'importance de l'œdème cérébral (Lu et al., 2007). L'utilisation d'antagonistes de ce transporteur bloque l'expression d'AQP 4 (Rao et al., 2011).

A côté de ces observations, le rôle central de l'AQP4 a été souligné également dans la résorption de l'œdème cérébral sur des modèles de traumatisme chez le rat jeune chez qui cette phase œdémateuse est particulièrement importante (Fukuda et al., 2012).

Au cours du traumatisme crânien, l'œdème cérébral peut évoluer pendant plus de 3 semaines. Les contusions hémorragiques focales se caractérisent par du tissu nécrotique central. Dans les 2-3 jours, un œdème cellulaire va progressivement se développer vers la région périfocale sans réelle atteinte de l'intégrité de la BHE. En cas d'atteinte de la barrière hématoencéphalique, on assiste à un œdème vasogénique dans les 6 heures suivants le traumatisme. Au-delà de ce délai, c'est l'œdème cellulaire qui va dominer.

- Lésions axonales diffuses

Cette entité à part met en jeu d'autres mécanismes (Lipton et al., 2008). Les travaux de Povlishock, ont retrouvé deux types de lésions axonales (Povlishock and Christman, 1995) :

- Modification de la perméabilité de l'axolème, avec œdème mitochondrial, et altération du cytosquelette

- Arrêt du transport axonal et œdème axonal localisé, sans modification de la perméabilité de l'axolème et altération du cytosquelette.

L'ensemble de ces lésions conduit à une disconnexion avec évolution vers une dégénérescence Wallerienne. Ces mécanismes peuvent se prolonger jusqu'à plusieurs mois après le traumatisme.

Les lésions induites par le TC sont donc diverses et complexes rendant la recherche thérapeutique dans ce domaine souvent limitée devant l'étendue des mécanismes mis en œuvre.

LA QUETE DE LA NEUROPROTECTION

Le terme de "Neuroprotection" s'applique à tout traitement initié avant le mécanisme lésionnel afin de limiter les conséquences cellulaires et vasculaires induites. A ce terme s'oppose le terme de "Neuroréanimation" (« neuroresuscitation ») qui lui s'attache à regrouper l'ensemble des thérapeutiques débutées après le mécanisme lésionnel ayant pour objectif de traiter le cerveau lésé. Or comme nous l'avons vu, que ce soit suite à une ischémie ou un traumatisme crânien, ces situations induisent des lésions primaires mais également des mécanismes secondaires, tels que la nécrose, l'apoptose ou l'inflammation, dont l'évolution persiste longtemps après la lésion initiale. Le terme de Neuroprotection peut donc être adapté en post-ischémie ou trauma afin de contrôler ces mécanismes délétères. La compréhension des différents mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dégénérescence cellulaire post-ischémique ou post-traumatique, a conduit à rechercher des traitements neuroprotecteurs. En ce qui concerne la souffrance ischémique post-arrêt cardiaque, elle peut être approchée par la recherche sur la souffrance ischémique post-AVC. Bien que l'effet neuroprotecteur d'un nombre important de molécules anti-excitotoxiques (antagonistes NMDA et AMPA), anti-apoptotiques (bloqueurs de caspases) et anti-oxydantes ait été démontré dans de nombreux modèles animaux, ces molécules restent inefficaces ou ont trop d'effets secondaires en clinique (Lee et al., 2000a). Comme nous l'avons vu, les récepteurs au glutamate jouent un rôle central dans l'excitotoxicité. Les *antagonistes ciblant les récepteurs NMDA* (Selfotel®), AMPA (YM872, MPQX) ou leurs canaux (Cerestat®) se sont révélés inefficaces en clinique humaine. Des traitements limitant la dépolarisation neuronale (fosphenytoïne, acide γ -aminobutyrique GABA mimétiques) ou diminuant l'entrée de Ca^{2+} (Nimodipine) ont également été des échecs, en partie dus à l'importance des effets indésirables associés à ce genre de thérapeutiques (somnolence, atteintes respiratoires,...).

La limitation des effets liés au stress oxydant, par l'utilisation de « piègeurs » de radicaux libres (Citicoline, Edaravone, NXY-059, Tirilazade) a également été une voie de recherche dont les résultats ont été mitigés.

L'approche *anti apoptotique* (inhibiteurs de caspases) a un intérêt théorique du fait du délai d'apparition de ces mécanismes permettant une administration plus tardive des traitements. Cependant, cette administration retardée favorise le sauvetage de cellules potentiellement altérées fonctionnellement.

La *régulation de l'inflammation* (Ac anti InterCellular Adhesion Molecule 1 (ICAM1), AC anti leucocytes integrines CD11/CD18, Antagonistes récepteurs IL-1) pourrait avoir une action sur des modèles d'ischémie focale mais a peu été étudiée en ischémie globale.

Les *inhibiteurs de l'HMG CoA reductase (Statines)* ont une action pléiotrope associant une action anti-excitotoxicité (Wang et al., 2007), anti-apoptotique, anti-inflammatoire et diminuant l'œdème sur des modèles de traumatismes crâniens expérimentaux. Les travaux cliniques ne retrouvent qu'un effet modeste de la rosuvastatine sur les fonctions cognitives chez les traumatisés crâniens graves (Tapia-Perez et al., 2008).

Les *neurostéroïdes*, tels que la Progestérone ont également une action anti-excitotoxique (Smith, 1991), modulent l'apoptose (Yao et al., 2005), et limitent les lésions liées au stress oxydant par régulation de la superoxide dismutase (Roof et al., 1997). Les 2 études cliniques randomisées humaines concluent à un bénéfice potentiel du traitement par la Progestérone chez les patients traumatisés crâniens (Wright et al., 2007) (Xiao et al., 2008). Cependant, les faibles effectifs inclus dans ces études rendent les résultats discutables.

La *Cyclosporine A* par action sur le pore de transition mitochondrial (mPTP) pourrait avoir une action protectrice en diminuant la taille lésionnelle post-TC, ou en atténuant la peroxydation lipidique (Szabo and Zoratti, 1991) (Sullivan et al., 1999). Les données cliniques concernant la cyclosporine sont à l'heure actuelle encore trop hétérogènes quant au délai d'administration pour conclure.

D'autres traitements sont encore à des phases expérimentales mais semblent prometteurs (*Diketopiperazine*, *antagonistes de la substance P*, *régulateurs de canaux endothéliaux*, *inhibiteurs du cycle cellulaire*, *inhibiteurs de caspases*, *inhibiteurs de polymérase (PARP)*). L'*érythropoïétine* a également des effets neuroprotecteurs intéressants maintenant bien décrits expérimentalement (Velly et al., 2010). Les résultats de l'étude EPO-ACR 2, viennent d'être présentés et ne retrouvent cependant pas d'amélioration pronostique chez les patients victimes d'un ACR et traités pendant 48h par EPO (40 000UI). Par contre les patients traités présentaient une augmentation significative du risque thrombotique.

L'apport *d'oxygène sous forte pression*, en particulier par médecine hyperbare a également été proposé dans le contexte mais avec des résultats qui restent encore peu probants cliniquement malgré un fort niveau de preuves expérimentales (Chhor et al., 2013) .

Actuellement, le seul traitement ayant prouvé son efficacité en expérimental et en clinique sur le pronostic neurologique post ACR est *l'hypothermie*. L'efficacité peut être reliée à son action pléiotrope. En effet l'hypothermie modérée en dehors de son effet métabolique pur, diminuant la consommation en O₂ (CMRO₂), a également une action sur les différents mécanismes mis en jeu en post-ischémie ou trauma. L'hypothermie semble être liée à une diminution de l'accumulation de glutamate, ou de calcium intracellulaire, diminue le nombre d'espèces réactives oxygénées, diminue l'importance de l'œdème ou encore limite les mécanismes inflammatoires ou apoptotiques (Liu and Yenari, 2007). Certains travaux expérimentaux ont montré qu'une hypothermie profonde (4°C), induite d'emblée pendant la phase d'arrêt cardiaque et associée à un "rinçage" de la circulation artérielle par du sérum froid, permettait d'obtenir une neuroprotection suffisante sur des délais atteignant 60 minutes, temps nécessaire à la mise en place d'une circulation extra-corporelle d'assistance. Ces travaux, à l'origine du concept de "suspended animation", offrent des perspectives de recherche clinique supplémentaire (Nolan et al., 2003). Chez l'humain, cette hypothermie à la phase précoce de l'arrêt cardiaque, constitue le seul

traitement efficace sur les lésions neurologiques. Au début des années 2000, deux études randomisées, l'une européenne et l'autre australienne, ont confirmé le bénéfice de l'hypothermie thérapeutique au décours d'un arrêt cardiaque (Bernard et al., 2002) (Patil et al., 2011). Au cours de ces deux études, plus de 200 patients ont été inclus immédiatement après un arrêt cardiaque lié à une fibrillation ventriculaire. Les résultats de ces deux études convergeaient pour montrer une amélioration significative de la survie et une diminution des séquelles neurologiques chez les patients traités par hypothermie. D'après ces études, le nombre de patients à traiter par hypothermie pour sauver un patient avec un état neurologique satisfaisant à distance serait de 6 (intervalle de confiance 95% : 4-13). Actuellement, les recommandations internationales de prise en charge de l'arrêt cardiaque chez l'adulte comprennent une hypothermie maintenue pendant 12 à 24 heures au décours d'un arrêt cardiaque extra-hospitalier, particulièrement lorsqu'il est lié à une fibrillation ventriculaire (Ewy, 2005). De plus, pour la plupart des experts, la réalisation d'une hypothermie thérapeutique doit être discutée pour toutes les victimes d'arrêt cardiaque, quels que soient le lieu de survenue ou le rythme cardiaque initial. Cependant une étude récente vient tempérer ces résultats. En effet ce travail a montré que l'utilisation de l'hypothermie précoce dans l'ACR, en phase pré hospitalière, n'améliorait pas le pronostic des patients (Kim et al., 2014). Dans le traumatisme crânien les résultats sont discutés. Les travaux de Clifton, au début des années 2000, ne retrouvent pas d'effet de l'hypothermie sur le devenir des patients victimes d'un traumatisme crânien (Clifton, 2000). Les métaanalyses ne retrouvent pas un gain en faveur de l'hypothermie systématique pour les patients traumatisés crâniens (Sinclair and Andrews, 2010). L'étude NABIS 2, comparant de manière randomisée hypothermie modérée par rapport à normothermie ne retrouve pas de différence significative entre les groupes. Arrêtée avant la fin des inclusions, elle retrouvait plus d'épisodes d'HTIC dans le groupe hypothermie (Clifton et al., 2011). A l'opposé, Marion et al. trouvaient un effet positif sur la mortalité et la récupération des patients traumatisés graves ayant présenté une poussée

d'hypertension intracrânienne résistante aux thérapeutiques standards (Marion et al., 1997). Les poussées d'hypertension intracrâniennes étant un facteur pronostic indépendant, un intérêt potentiel de l'hypothermie pourrait se situer dans le contrôle de celles-ci. En attente des résultats de l'étude Eurotherm (Andrews et al., 2013), étude multicentrique s'intéressant à l'effet de l'hypothermie sur les poussées d'hypertension intracrâniennes, celle-ci est recommandée en seconde ligne de traitement dans les poussées d'hypertension intracrâniennes réfractaires (Bratton et al., 2007a).

Il apparaît donc clairement que nous ne disposons que de peu de moyens thérapeutiques solides pour limiter les lésions induites par l'ischémie ou le trauma, d'où la nécessité de rechercher de nouvelles stratégies de neuroprotection. Ces stratégies doivent répondre à une exigence qui est le caractère pléiotrope de leur action, car comme nous l'avons vu l'ensemble des mécanismes lésionnels mis en place en post- ACR ou traumatique est très divers. Un intérêt particulier doit être porté également au délai d'administration de la molécule qui conditionne son effet et qui pourrait constituer la première raison des échecs observés lors du passage à l'expérimentation humaine. Les discordances rencontrées entre études expérimentales encourageantes et études cliniques décevantes peuvent également venir de la différence entre des animaux jeunes et sains subissant un trauma ou une ischémie globale et les patients humains souvent polyopathologiques et parfois âgés. L'intérêt pour cette neuroprotection conduit à précipiter les études cliniques avant d'avoir validé l'ensemble des points nécessaires en expérimental. Dans ce contexte, apparaissent certaines recommandations de bonnes pratiques dans d'autres pathologies comme les AVC (STAIR : Stroke Therapy Academic Industry Roundtable) proposant de tester les agents sur plusieurs modèles et dans différents laboratoires, d'évaluer le pronostic fonctionnel à long terme des animaux testés, de définir des fenêtres thérapeutiques, de réaliser des courbes doses- réponses avant de passer aux études cliniques souvent vouées à l'échec sans cela.

UN CONCEPT REVOLUTIONNAIRE :

LA NEUROGENESE

A côté des mécanismes de dégradations cellulaires que nous avons décrits précédemment, apparaissent de manière plus tardive des mécanismes de plasticité cérébrale et de réparation tissulaire qui étaient jusqu'à récemment peu connus (Figure 9). Alors que le dogme d'un nombre de neurones fixe dans le cerveau était accepté par tous (Cajal, 1913), il y a 100 ans un concept révolutionnaire voyait le jour. Allen décrit pour la première fois dans le cerveau de rats, la présence de cellules immatures se divisant après la naissance (Allen, 1912). Avec des moyens de plus en plus précis permettant de marquer les cellules en division, Altman et son équipe confirment ces résultats et localisent ces cellules sur deux zones bien définies cérébrales (Altman, 1969; Altman and Das, 1965; Altman and Das, 1966). Ces deux zones sont la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone sous-gyrale (SGZ) du dentate gyrus au niveau de l'hippocampe (Figure 10). Eriksson est le premier à décrire la présence de cellules en prolifération dans le cerveau humain au niveau du DG (Eriksson et al., 1998). Des données récentes décrivent d'autres zones de neurogénèse au niveau de l'hypothalamus et du cortex (Magavi et al., 2000) (Gould, 2007) (Bonfanti and Ponti, 2008) (Migaud et al., 2010). Les cellules de la zone sous-ventriculaire (SVZ), en plus de se diviser sont capables de migrer le long du faisceau rostral du bulbe olfactif et de se différencier en neurones granulaires et périglomérulaires (Lois and Alvarez-Buylla, 1994). Ces cellules permettent de maintenir et de réorganiser le bulbe olfactif de manière régulière. Au niveau de la zone sous-gyrale, la migration est moins importante dans la zone granulaire du dentate gyrus. Ces cellules sont capables de réaliser des projections au niveau de la zone CA3 de l'hippocampe (Tanaka et al., 2004). En moyenne, le nombre de cellules immatures formées est de 200-300 par jour dans un hippocampe, et seulement la moitié survit. Ce nombre diminue avec l'âge de l'animal étudié. Ces mécanismes sont présents en situation physiologique mais sont potentialisés au cours des lésions cérébrales. Au cours d'une lésion ischémique, les mécanismes décrits au niveau du dentate gyrus sont stimulés avec apparition de

nouveaux axones vers le CA3, 10 semaines après la lésion (Sun et al., 2007). L'inhibition de ces mécanismes de neurogénèse conduit à une altération de l'apprentissage hippocampique (Wang et al., 2005) et perturbe la récupération neurologique (Jin et al., 2010). Les nouvelles connexions favorisent la mémorisation à long terme (LTP) (van Praag et al., 2002) et contribuent à l'apprentissage et au développement de la mémoire (Bendel et al., 2005) (Schinder and Gage, 2004; Shors et al., 2001).

Les cellules immatures peuvent aussi migrer vers la lésion ou vers les zones de pénombre induites par l'ischémie (Arvidsson et al., 2002) (Gu et al., 2000) (Jiang et al., 2001). Des études réalisées sur des modèles d'ischémie globale ont retrouvé des cellules en prolifération au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe qui avait été détruite par la souffrance ischémique (Nakatomi et al., 2002) (Bendel et al., 2005). Les mécanismes conduisant à la stimulation de ces voies de prolifération ne sont pas encore bien connus mais les mécanismes glutamanergiques pourraient réguler cette prolifération par l'intermédiaire de la voie de la NO synthase (Cameron et al., 1995) (Zhang et al., 2001). Une fois que les cellules se sont multipliées et ont migré, elles sont capables de se différencier en neurones, cependant le rendement reste faible (Arvidsson et al., 2002). Cette différenciation dépend de plusieurs protéines (Noggin, Neurogenesis-1, HES 6) qui sont capables de moduler l'activité de Bone Morphogenic Protein (BMP) impliquée dans le développement et la différenciation (Jhas et al., 2006; Lim et al., 2000; Ueki et al., 2003).

Après un traumatisme ou une ischémie, on assiste également à un autre mécanisme de remodelage: le remodelage vasculaire (Greenberg and Jin, 2005). Ce remodelage vasculaire inclut l'angiogénèse, correspondant à la création de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants et la vasculogénèse correspondant à l'apparition de nouveaux vaisseaux dépendant de progéniteurs provenant de la moëlle (Figure 11).

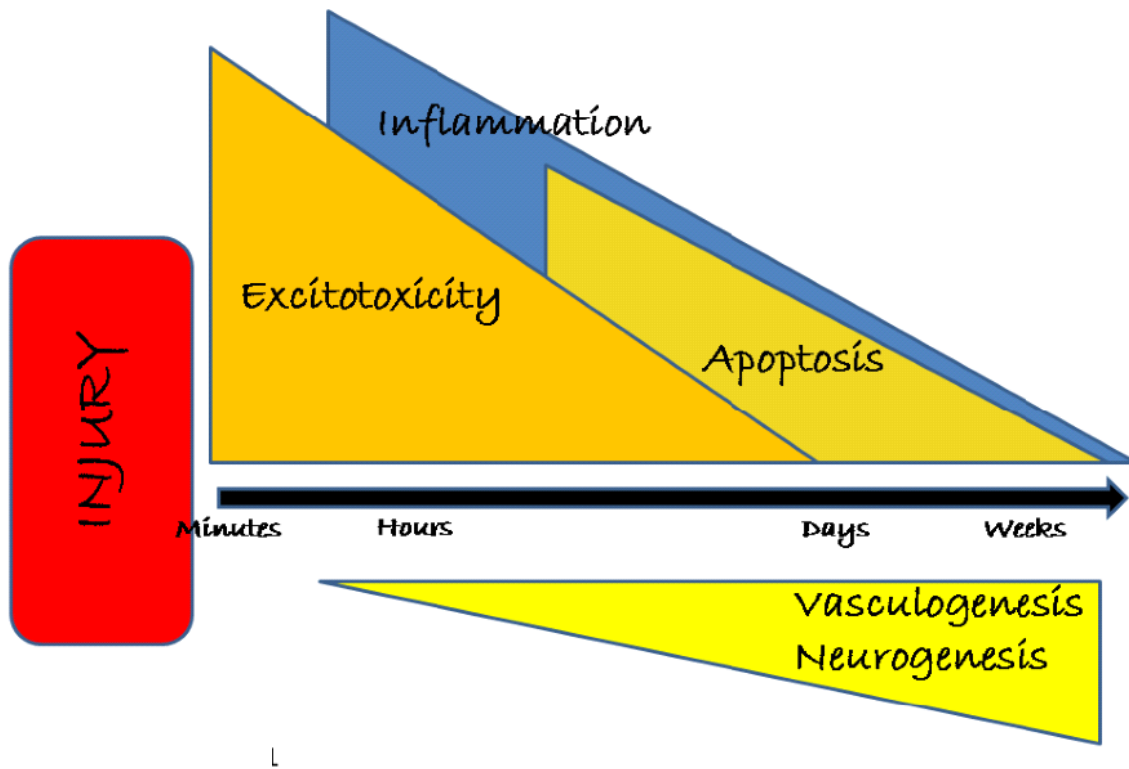


Fig 9: Déroulement temporel des mécanismes impliqués dans la Neuroprotection et dans la réparation tissulaire post-ischémie et post-traumatique.

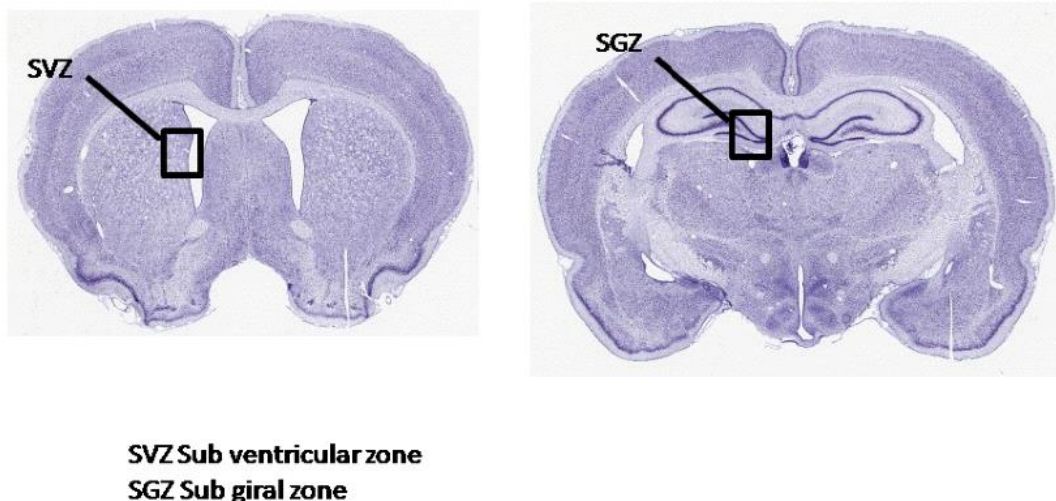


Figure 10: Zones cérébrales de Neurogénèse

L'angiogénèse est un mécanisme apparaissant par étape, comprenant une phase de prolifération cellulaire, de migration, d'organisation tubulaire puis d'anastomose (Risau, 1997). Celle-ci commence plus tôt que la neurogénèse dont nous venons de

parler, afin très probablement de favoriser le développement d'un microenvironnement propice aux précurseurs neurogéniques. Ce mécanisme endothélial commence entre 12h et 21 jours après la lésion, selon les espèces (Jin et al., 2001). Cette prolifération dépend du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sécrété par les cellules vasculaires et qui est "up-régulé" lors d'une lésion cérébrale. Son expression, active la prolifération des progéniteurs neuronaux, favorise la survie de ceux-ci et initie l'angiogénèse (Lee and Agoston, 2010). Il semble donc que le VEGF constitue une cible intéressante dans le contrôle de la neurogénèse, car il se situe au carrefour des différentes voies prolifératives.

Un autre système régulateur de la neurogénèse semble être également l'environnement vasculaire composé des cellules endothéliales, des péricytes, de la membrane adventitielle, des facteurs solubles et de la matrice extracellulaire (ECM). En effet la laminine, les métalloproteinases, les intégrines ($\beta 8$ integrin, N-Cadherin) (Shen et al., 2008) ont un rôle dans la migration des cellules immatures et l'ECM joue également un rôle de "trappe" des facteurs de croissance, permettant une prolifération et une différenciation cellulaire (Kerever et al., 2007). La glie joue par ailleurs un rôle important dans la différenciation et la migration des cellules.

La régulation du remodelage axonal a été bien étudiée dans ce domaine (Bradbury et al., 2002; Lee et al., 2004; Moon et al., 2001; Seymour et al., 2005), dépendant de neurofilaments abondants dans les axones et les dendrites (Li et al., 2010).

L'augmentation de la densité axonale peut durer jusqu'à un an post-ischémie.

L'imagerie IRM nous permet d'objectiver cette réorganisation (Grefkes et al., 2008). A coté de ces mécanismes, des projections trans-calleuses ont également été décrites au cours des lésions cérébrales induites (Liu et al., 2008).

On observe également un développement de nouvelles synapses appelé synaptogénèse (Scheff et al., 2005). Celle-ci semble être sous la dépendance du complexe cadherine-catenine (Arikath and Reichardt, 2008).

L'ensemble de ces observations ont donc conduit logiquement à s'intéresser à des voies de stimulation de ces mécanismes de restauration.

Bone Marrow Stromal Cells (MSC) - Les cellules souches

Les cellules souches peuvent être isolées, mises en culture et semblent avoir une action sur la limitation de l'inflammation, une action neurotrophique sur des modèles d'ischémies focales (Onteniente, 2013). Sur un modèle de traumatisme crânien chez le rat, des cellules souches injectées par voie intraveineuse (IV) ont été capables de migrer vers les zones lésées. Les animaux traités avaient une amélioration de leur pronostic de récupération moteur mesuré à distance (Lu et al., 2001). Des résultats similaires ont été décrits en injection stéréotaxique au niveau de la zone lésée (Mahmood et al., 2001). La culture des cellules souches semble être améliorée par l'adjonction de facteurs de croissance tels que le BDNF ou le NGF (Mahmood et al., 2002). En clinique humaine, la faisabilité de cette thérapeutique a été évaluée dans deux études, en traumatologie (Cox et al., 2011; Zhang et al., 2008). Une étude de pédiatrie a permis de montrer que le pronostic des enfants traités par des injections IV de cellules souches était augmenté après 180 jours d'un traumatisme crânien grave par rapport à un groupe témoin (Cox et al., 2011). Des données identiques ont été retrouvées chez l'adulte recevant ce traitement en IV et par injection cérébrale per opératoire (Zhang et al., 2008).

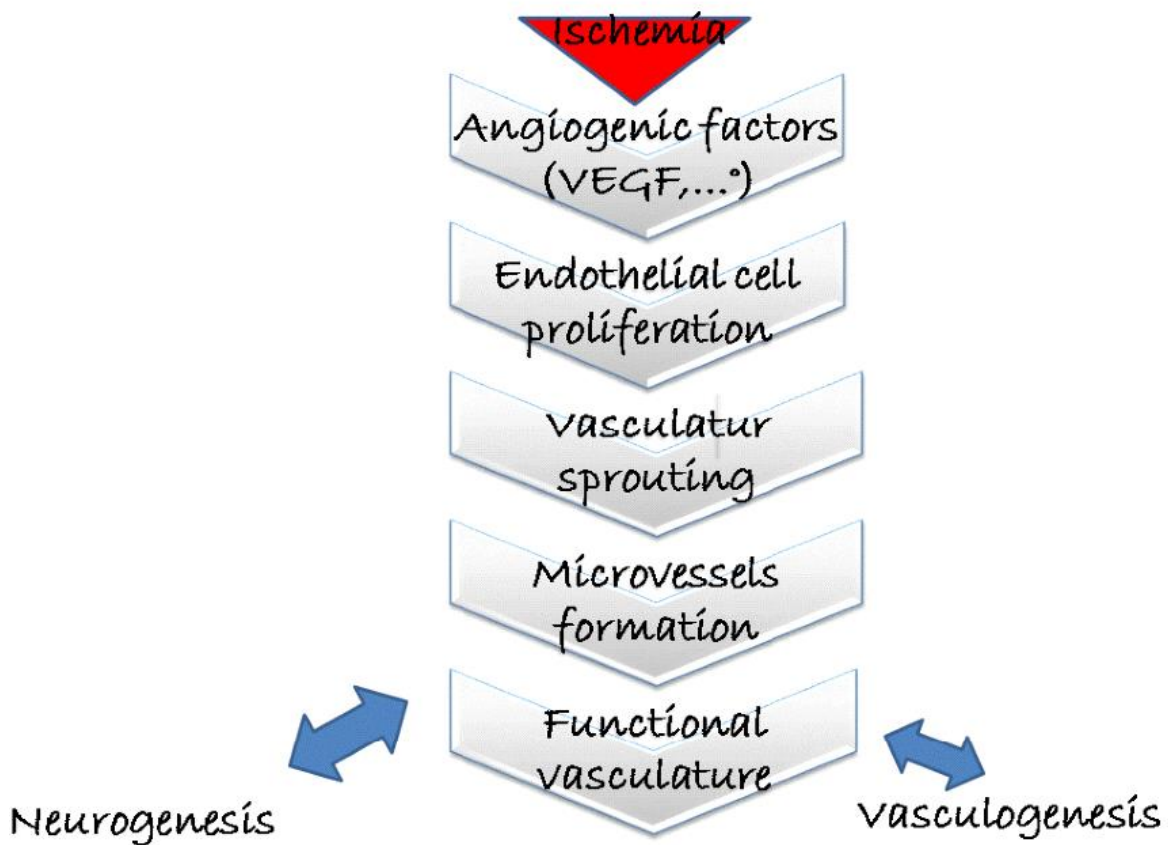


Fig 11: Mécanismes impliqués dans la Neurogénèse et la Vasculogénèse

L'erythropoietine (EPO)

L'EPO est un facteur de croissance hématopoïétique exerçant une action neurotrophique au niveau cérébral. Décrit pour la première fois par Masuda dans un modèle d'ischémie focale, mimant l'AVC, l'EPO augmente son taux après une lésion cérébrale particulièrement au niveau de la zone de pénombre (Masuda et al., 1993). Un recombinant humain de l'EPO (rhEPO) a été utilisé pour comprendre le mécanisme d'action. En dehors de l'effet neuroprotecteur (antiapoptotique, inhibition de l'excitotoxicité, du stress oxydant, action sur la barrière hématoencéphalique), il favorise l'angiogénèse et la restauration du flux sanguin cérébral (Li et al., 2007). Il stimule l'expression de VEGF entre 3 et 21 jours post-AVC au niveau de la zone de pénombre (Wang et al., 2004). L'injection d'EPO stimule également la prolifération cellulaire au niveau de la SVZ et favorise la migration cellulaire (Wang et al., 2004). L'étude de l'effet de l'EPO uniquement sur la neurogénèse est difficile chez l'humain. Son utilisation dans les AVC, rapporte des résultats contradictoires. Une étude retrouve une amélioration du pronostic neurologique, sans réduction du volume cérébral infarcté chez des patients traités pendant 3 jours par EPO (Ehrenreich et al., 2002). Une autre étude rapporte un nombre important d'effets indésirables chez les patients traités par rhEPO limitant son utilisation (Corwin et al., 2007). Les résultats de l'étude EPO-ACR 2 sont comme nous l'avons dit décevants dans le cadre de l'ACR (NCT 00999583). Chez les patients traumatisés crâniens, une investigation à long terme du devenir est actuellement en cours (NCT00313716).

Statines

Initialement utilisées pour diminuer le taux de cholestérol, les effets positifs associés au niveau cérébral ont été découverts. Le mécanisme d'action semble être en rapport avec une diminution du complexe isoprénolide, dérivé du cholestérol, composé important au niveau du cerveau (Ostrowski et al., 2007). Comme l'EPO, les statines ont un effet neuroprotecteur (anti-apoptotique, anti-inflammatoire, augmentation du

débit sanguin,...) mais également un effet neurorégénérateur. Sur des modèles de rats traumatisés crâniens, on observe une stimulation de la synaptogénèse et de l'angiogénèse après administration de statines (Lu et al., 2004). Il n'existe aucune donnée de ce mécanisme neurorégénérateur actuellement chez l'homme.

Autres traitements

Thymosine Béta 4 (TB4), polypeptide de 43 acides aminés favorise la prolifération des neurites et l'angiogénèse (Xiong et al., 2011). D'autres molécules ont une action neuroproliférative retrouvée expérimentalement mais sans données cliniques (fibroblast growth factor-2 (FGF-2), epidermal growth factor (EGF) (Doetsch et al., 2002), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), BDNF (Leventhal et al., 1999), Hes 1 and Notch (Shen et al., 2004)), oestrogènes, sérotonine, norepinephrine, antidépresseurs, lithium (Boku et al., 2010), corticostéroïdes (Kempermann, 2002)). La cyclosporine A permet également, de manière expérimentale, une prolifération de cellules immatures, et une régénération corticale avec une récupération fonctionnelle à distance (Erlandsson et al., 2011) .

A côté de ces moyens pharmacologiques, la stimulation sensori-motrice joue un rôle important par la voie de l'Apo E (Ruscher et al., 2009). Après exercice, on observe une augmentation de cellules immatures au niveau du dentate gyrus avec une augmentation du taux de BDNF (Kobilo et al., 2011). L'environnement enrichi a un effet sur la plasticité synaptique, favorise l'arborisation neuronale, et augmente les taux de synaptophysine dans l'hippocampe et le cortex (Beauquis et al., 2010; Ip et al., 2002; Lambert et al., 2005). La stimulation magnétique transcranienne (TMS) favorise également ces mécanismes de neurorégénération post-lésionnels (Gordon et al., 2007).

Comme pour le côté neuroprotecteur, toutes ces découvertes expérimentales n'ont malheureusement, pour la plupart, pas passé le cap de l'expérimentation humaine. Différentes raisons peuvent expliquer ce phénomène:

- Des différences entre modèles animaux et humains (taille du cerveau, hétérogénéité des lésions induites en clinique humaine,...)
- Des facteurs de risques associés, qui sont souvent peu évalués en expérimental et qui jouent un rôle majeur en clinique (Chen and Sun, 2007) (Chen et al., ; Duan et al., 2000).
- Des délais d'administration pouvant jouer un rôle important avec des passages d'effets bénéfiques à aggravation selon le timing de prise (Kilic et al., 2010).
- Des difficultés à associer récupération neurologique et neurogénèse, du fait des effets pléiotropes des différentes molécules.

Par conséquent, cette phase de neurorégénération, même si elle nous semble prometteuse, ne doit pas nous faire oublier qu'il reste encore beaucoup de travail pour mieux l'approcher et que le passage à la thérapeutique humaine est encore loin.

**LA MEDECINE TRADITIONNELLE
CHINOISE :
UNE NOUVELLE ALTERNATIVE ?**

La Médecine Traditionnelle Chinoise (MTC) est le fruit de la transmission du savoir et de l'expérience des Anciens, dans une histoire et un cadre culturel précis : la civilisation chinoise. On peut la qualifier ainsi d' "ethnomédecine". Dans un premier temps, cette transmission s'est surtout faite oralement, puis petit à petit par des documents écrits (les premiers recueils datent de 400 avant JC " Le classique ordonné de l'Acupuncture de Huangfu Mi"). Cette médecine a été pratiquée sans discontinuité depuis plus de 3000 ans. Le principe fondamental est un équilibre entre des forces positives et négatives, le yin et le yang. Au fil des temps, d'autres postulats ("théorie des 5 mouvements") sont venus l'enrichir. Cette médecine s'appuie sur une pharmacopée riche à base de plantes. Bien que loin de notre culture scientifique occidentale, l'atout principal de cette médecine repose sur une énorme expérience reposant sur des dizaines de millions de malades, avec des résultats qui ont parlé au fil du temps. L'action neurologique anti-ischémique de cette pharmacopée a maintenant été étudiée dans différentes études scientifiques. Par exemple, Zheng et al. ont montré un effet du *Ginseng* (25mg/kg pendant 3 j), donné en pré-médication avant une ischémie focale sur la récupération fonctionnelle et la stimulation de la neurogénèse évalués à J14 (Zheng et al., 2011). Le *tetramethyl pyrazine* a également une action neuroprotectrice et neurorégénérative dans les mêmes conditions (Xiao et al., 2010). Sur un milieu dépourvu d'oxygène et de glucose, le *Panax notoginseng saponins*, stimule la prolifération et la différenciation cellulaire (Si et al., 2011). Le *Dracocephalum tanguticum maxim extract* a une action anti- oxydante et une action neurotrophique associée décrite dans l'ischémie (Xu et al., 2011). Le Bu-yang Huan-wu decoction (BHD) est une tisane chinoise utilisée depuis des millénaires dans le cadre des AVC. L'étude génomique de ce produit souligne son effet pléiotrope, du fait d'une stimulation des gènes codant pour des molécules anti-inflammatoires, anti-oxydantes, mais également pour des facteurs de croissance, tels que VEGF (Cai, 2007).

NeuroAid® (MLC601) est un produit d'origine chinoise, comprenant 14 composés sélectionnés pour leur efficacité et leur absence d'effets secondaires: 9 composés végétaux: Radix astragali, Radix salviae mitorrhizae, Radix paeoniae rubra, Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis, Carthamus tinctorius, Prunus persica, Radix polygalae et Rhizoma acori tatarinowii et 5 composés animaux: Hirudo, Eupolyphaga seu steleophaga, Calculus bovis artifactus, Buthus martensii et Cornu saigae tataricae). Il a été enregistré en 2001 par le "Sino Food and Drug Administration" et est actuellement enregistré et commercialisé sous le nom de NeuroAid® par Moleac (Singapore). Une formulation simplifiée du MLC601 appelée MLC901 basée sur ses 9 composés végétaux vient d'être mise au point. NeuroAid® est utilisé depuis plusieurs années en Asie, dans le cadre de pathologies neurologiques ischémiques.

Des études cliniques...

Dans ces pays, NeuroAid® a déjà été évalué dans des essais cliniques. La première étude clinique publiée sur ce produit a été réalisée en 2000 et a comparé l'action de deux composés le *Buchang Naoxintong Jiaonanga* et *Danqi Piantang Jiaonang* (DJ) utilisés en Médecine Traditionnelle Chinoise sur la récupération fonctionnelle post-AVC sur un collectif de 605 patients. Les résultats étaient en faveur du DJ, en prenant comme critère fonctionnel de récupération à 1 mois, le Comprehensive Function Score composant du Diagnostic Therapeutic Effects of Apoplexy scale (RR= 2.4; 95% CI, 1.28 to 4.51; P=0.007) (Chen et al., 2009). Depuis, plusieurs études cliniques ont été menées sur ce produit et une revue récente de la littérature sur les données cliniques du MLC601 a été publiée récemment (Siddiqui et al., 2013). Cette revue complète de la littérature retrouve 30 citations sur le sujet, mais seulement 5 études sont réellement interprétables. Les principales caractéristiques de ces études sont regroupées sur le tableau 1 (Chen et al., 2009; Harandi et al.)

(Bavarsad Shahripour et al., 2011; Harandi et al., 2011) (Bavarsad Shahripour et al.; Ghandehari, 2011; Kong et al., 2009).

La récupération fonctionnelle et la récupération motrice dans ces études sont respectivement représentées sur les Figure 12 et 13. La récupération fonctionnelle, évaluée par le score de Barthel (BI), n'a été évaluée que dans deux études, mais avec une amélioration significative dans le groupe traité de deux fois supérieure par rapport au groupe Placebo, à 1 mois et à la fin des études. La récupération motrice par contre évaluée par le score de Fugl-Meyer semble être plus hétérogène, mais avec un effet temps qui semble important, puisque l'effet est significatif à 3 mois. Il est cependant à noter que nous n'avons, pour confirmer cela, qu'une seule étude réalisée à 3 mois pour AVC. Ces résultats doivent être tempérés par le caractère monocentrique des différentes études publiés et souvent sur de petits collectifs de patients. On remarque que l'ensemble des études publiées sur le sujet, ont inclus des patients ayant eu un AVC entre la première semaine et 6 mois, ce qui pourrait faire

envisager un impact important de la molécule sur les effets neuro régénératifs de la molécule, plus que neuroprotecteurs de celle-ci.

Table 1 : Principales études cliniques sur le MLC601 (Siddiqui et al.)

China 01 [7]	Multicenter, randomized, double-blind, active controlled trial conducted in China from 1999 to 2000	Inclusion criteria: Age 18–70 years, diagnosed with ischemic stroke according to Western medicine diagnosis standards in China, met requirements of TCM standards for diagnosis of apoplexy, DTER score ≥ 10 , at the restoration stage according to TCM criteria (i.e. 15 days to 6 months after stroke onset, provided informed consent) Exclusion criteria: TIA, lacunar infarct, or infarction of the basilar artery system, had other intracranial pathologies such as tumors, AF, other clinically significant systemic diseases, pregnancy and lactation	Intervention group: MLC601, 0.4 g, 4 capsules 3 times a day for 4 weeks Control group: Buchang Naoxintong Jiaonang, 4 capsules 3 times a day for 4 weeks	Primary outcome: Functional and neurological function as assessed on DTER Comprehensive functions score was dichotomized into 0 vs. 2–8 (which may be compared with a 0–1 vs. 2–5 dichotomy on mRS) The neurological/motor function was assessed by adding the first 7 subscores of the DTER
China 02 [7]	Multicenter, randomized, double-blind, active controlled trial conducted in China from 1999 to 2000	Inclusion criteria: Age 18–70 years, diagnosed with ischemic stroke according to Western medicine diagnosis standards in China, met requirements of TCM standards for diagnosis of apoplexy, DTER score ≥ 10 , at the restoration stage according to TCM criteria (i.e. 15 days to 6 months after stroke onset, provided informed consent)	Intervention group: MLC601, 0.4 g, 4 capsules 3 times a day for 4 weeks Control group: Buchang Naoxintong Jiaonang, 4 capsules 3 times a day for 4 weeks	Primary outcome: Functional and neurological function as assessed on DTER Comprehensive functions score was dichotomized into 0 vs. 2–8 (which may be compared with a 0–1 vs. 2–5 dichotomy on mRS) The neurological/motor function was assessed by adding the first 7 subscores of the DTER
Kong et al. [15]	Single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II pilot study conducted in a rehabilitation facility in Singapore	Inclusion criteria: Age 21–80 years, within 1 month of ischemic stroke, motor power of grade $< 5/5$ on the Medical Research Council Scale in at least 1 limb, prestroke mRS ≤ 1 , nonchild-bearing potential, cerebral infarction compatible with CT or MRI. Exclusion criteria: Recent thrombolysis, ICH, full-dose or long-term anticoagulation, significant nonischemic brain lesion, coexisting systemic diseases (cancers, renal/liver failure, dementia, psychosis, cirrhosis), previous stroke, craniotomy or seizures, aphasia or other cognitive disabilities, hemoglobin < 10 mg/dl	Intervention group: MLC601, 4 capsules 3 times a day for 1 month plus standard care Control group: Placebo, 4 capsules 3 times a day for 1 month plus standard care	Primary outcome: Motor impairment as assessed on FMA at 4 weeks Secondary outcomes: Functional status at 4 and 8 weeks as assessed on FIM; FMA scores and subscores at 4 and 8 weeks; stroke severity as assessed on NIHSS scores and subscores at 4 and 8 weeks Patients were also analyzed by severity category as severe (0–55), moderate (56–80) and mild (81–100) based on FMA scores
Harandi et al. [14]	Single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled trial conducted in a tertiary care center in Iran from July 2009 to Feb 2010	Inclusion criteria: Age 30–72 years, within 1 month of ischemic stroke as assessed by CT or MRI Exclusion criteria: Treatment with thrombolytic, ischemic stroke with hemorrhage, severe renal or liver failure, dementia, psychosis, history of seizure disorder, previous stroke and hemoglobin < 10 mg/dl	Intervention group: MLC601, 400 mg, 4 capsules 3 times a day for 3 months plus standard care Control group: Placebo, 4 capsules 3 times a day for 3 months plus standard care	Motor impairment as assessed on FMA at baseline, 4, 8 and 12 weeks Patients were also categorized as having severe (0–55), moderate (56–80) and mild (81–100) motor limitation based on FMA scores
Shahripour et al. [16]	Single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled study conducted in a tertiary hospital in Iran	Inclusion criteria: Age 60–80 years, acute brain infarct in MCA territory within a week confirmed by CT or MRI, hospitalized within 24 h of stroke Exclusion criteria: ICH, history of stroke, inability to	Intervention group: MLC601, 4 capsules 3 times a day for 3 months plus standard treatment	Primary outcome: MCA blood flow velocity as measured by transcranial Doppler at baseline and 3 months done by single

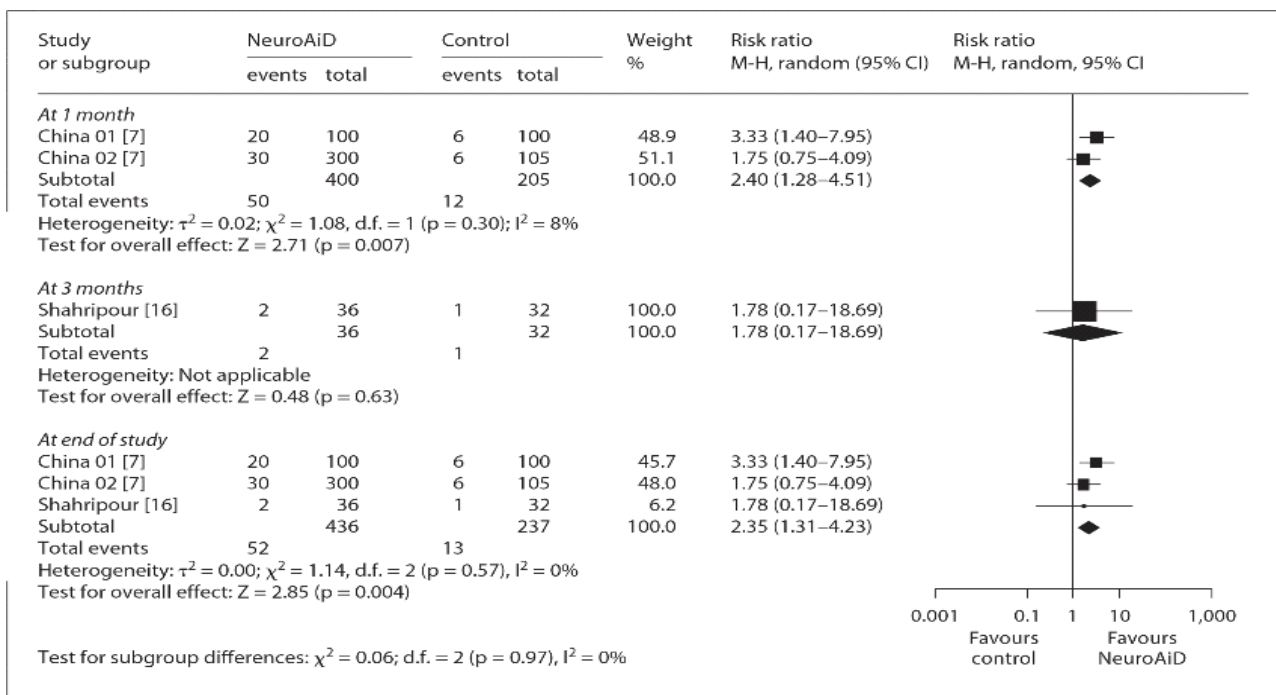


Figure 12 : Récupération fonctionnelle évaluée à 1, 3 mois et à la fin de l'étude (Siddiqui et al.)

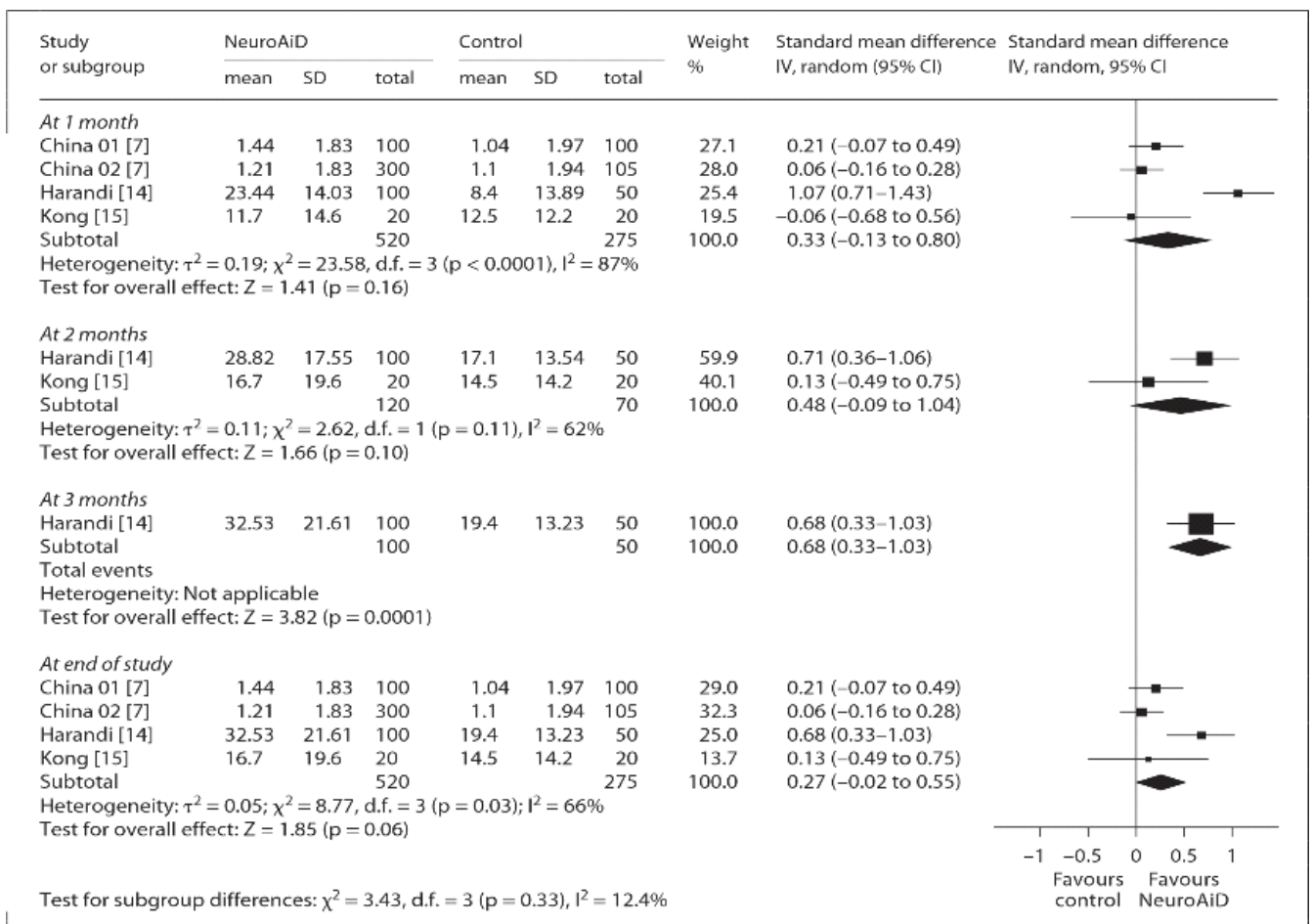


Figure 13: Récupération motrice évaluée à 1, 2, 3 mois et à la fin de l'étude (Siddiqui et al.)

Un essai clinique, multicentrique, randomisé pour étudier l'efficacité de NeuroAid face à l'AVC nommé CHIMES (CHinese Medicine NeuroAid Efficacy on Stroke recovery) vient de se terminer en Asie (Venketasubramanian et al., 2009) (Chen et al., 2013c). Cette étude multicentrique internationale (21 centres), randomisée, menée en double aveugle contre Placebo s'est intéressée à l'action du MLC601 sur une population ayant été victime d'AVC (Figure 14).

Les critères d'inclusion étaient :

Patient présentant un AVC

Recevant une anti aggrégation plaquettaire

Début des symptômes dans les 72h

Présentant un Rankin Scale 0 à 1 avant l'accident

Un score de $6 < \text{NIHSS} < 14$

Des images scannographiques ou IRM en faveur d'un AVC ischémique

Les critères d'exclusion

Patients thrombolysés

Patients nécessitant une anticoagulation efficace

Patients présentant une hémorragie intracérébrale

Présence de lésions ischémiques multiples

Une amélioration rapide du pronostic spontanée

Patients présentant des comorbidités graves (néoplasie, insuffisance rénale, cirrhose...)

Les patients recevaient le MLC601 ou le Placebo par voie entérale (4 capsules 3 fois par jour pendant 3 mois).

Le critère d'évaluation principal reposait sur l'évolution du score de Rankin modifié à 3 mois (mesuré également à 10 j, 1 mois et 3 mois).

Les critères secondaires :

L'évolution du score de NIHSS entre 10j et 3 mois

L'index de Barthel à 3 mois

Le mini mental test (MMS) à J10 et 3 mois

Le décès

Un objectif de 1100 patients a été calculé pour cette étude. Les patients ont été inclus entre novembre 2007 et Mai 2012, et étaient comparables entre les 2 groupes (Tableau 2).

Le résultat principal de cette étude ne retrouvait pas de différence significative entre les 2 groupes concernant le score de Rankin modifié évalué à 3 mois (Figure 15). On ne retrouve pas de différence entre les 2 groupes, concernant également les critères de jugement secondaires, tels que le NIHSS, Barthel, MMS, le décès (Figure 16). Il est à noter qu'il existe une absence de différence en termes d'effets indésirables induits par le produit par rapport au groupe Placebo dans CHIMES.

L'analyse en sous-groupe semble montrer que l'effet du MLC601 serait plus efficace chez les patients de sexe féminin et recevant le traitement au-delà de la 48^{ème} heure, comme cela était déjà le cas dans des études antérieures. On observe la même tendance chez les patients présentant des scores NIHSS plus élevés (11-14).

Les résultats de cette étude ont été regroupés avec ceux publiés antérieurement dans la dernière revue de la littérature publiée par Siddiqui et al. (Siddiqui et al., 2013). Dans le groupe traité tardivement, ils retrouvent ainsi un OR de 1,63 (95% CI, 1,20-2,22 ; p=0,0022) en faveur du traitement par NeuroAid sur la récupération à distance de l'épisode. L'effet retardé du produit est donc une nouvelle fois souligné dans cette étude (Figure 17).

Une analyse annexe des résultats de CHIMES a également permis de montrer une diminution des évènements vasculaires précoces (récidives AVC, IDM,...) post AVC chez les patients traités par MLC601 par rapport au groupe Placebo (Chen et al., 2013b). Une étude corrolaire à ce papier est actuellement en cours permettant d'évaluer la récupération neurologique à 2 ans post-AVC (CHIMES E-Study)

(Venketasubramanian et al., 2013). Une autre étude corrolaire, CHIMES-I est également prévue concernant l'analyse en sous-groupes des résultats tenant compte du délai de TDM, du type de lésions (Navarro et al., 2013). L'étude NEURITES (Chen et al., 2013a) se déroule actuellement dans l'hémisphère sud pour définir la place du MLC901 dans la prise en charge de l'altération cognitive vasculaire post-AVC. Cette étude devrait apporter de nouveaux éléments, particulièrement sur les données IRM qui lui sont attachées. D'autres études, évaluant ses effets à court et long terme, seul ou en combinaison avec l'aspirine ont montré sa non-toxicité chez des sujets sains et des patients ayant subi un AVC (Gan et al., 2008).

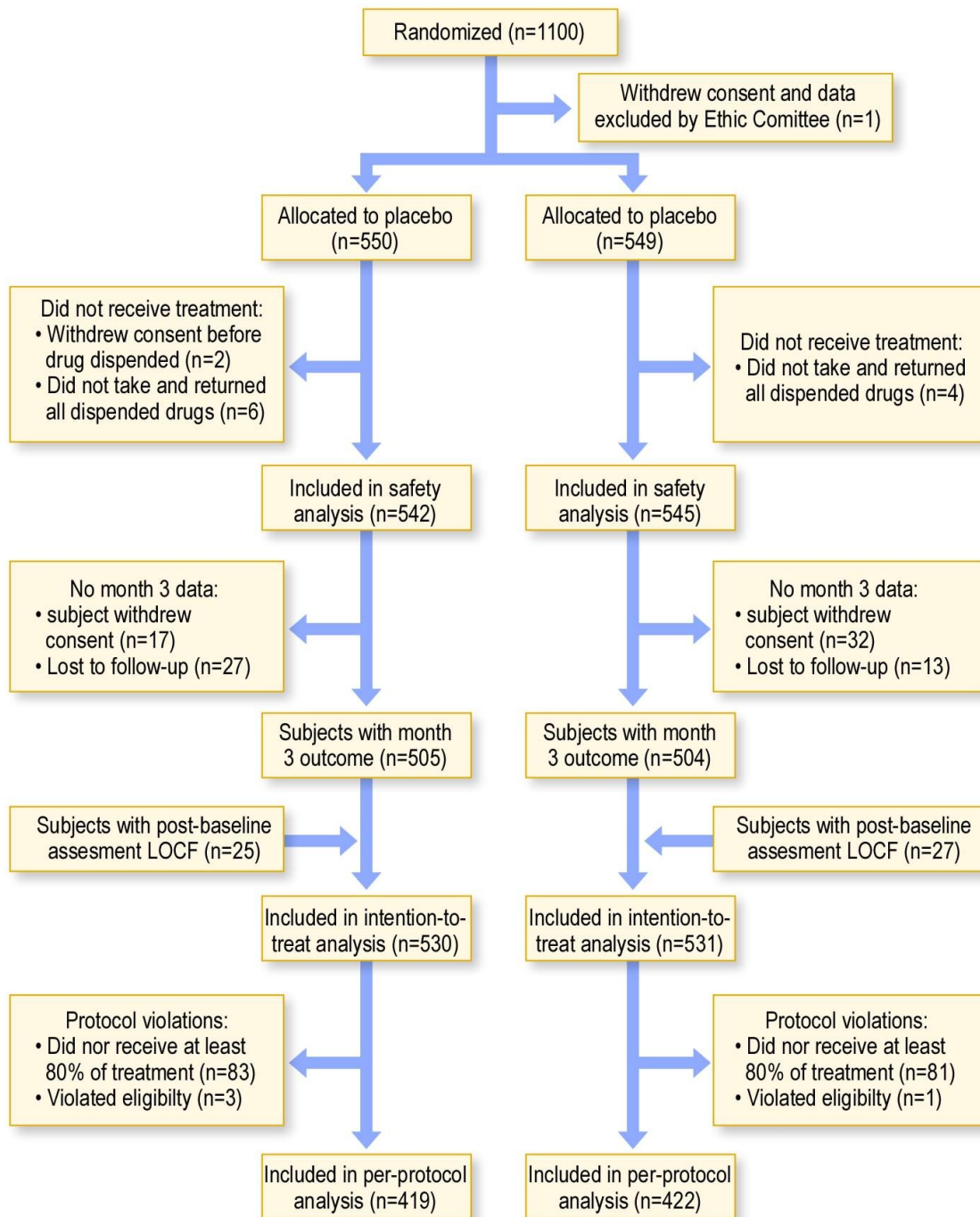


Figure 14: Flow shart CHIMES (Chen et al.)

	<i>NeuroAid (n=550)</i>	<i>Placebo (n=549)</i>
<i>Age (sd)</i>	61,3 (10,8)	61,5 (11,8)
<i>Femme (%)</i>	210 (38,2)	196 (35,7)
<i>NIHSS (sd)</i>	8,8 (2,5)	8,6 (2,5)
<i>Délai de randomisation h (sd)</i>	45,4 (16,9)	44,1 (17,4)
<i>Délai de traitement h (sd)</i>	48,5 (17,2)	47,4 (17,5)

Tableau 2: Comparaison des 2 groupes de patients Placebo et NeuroAid

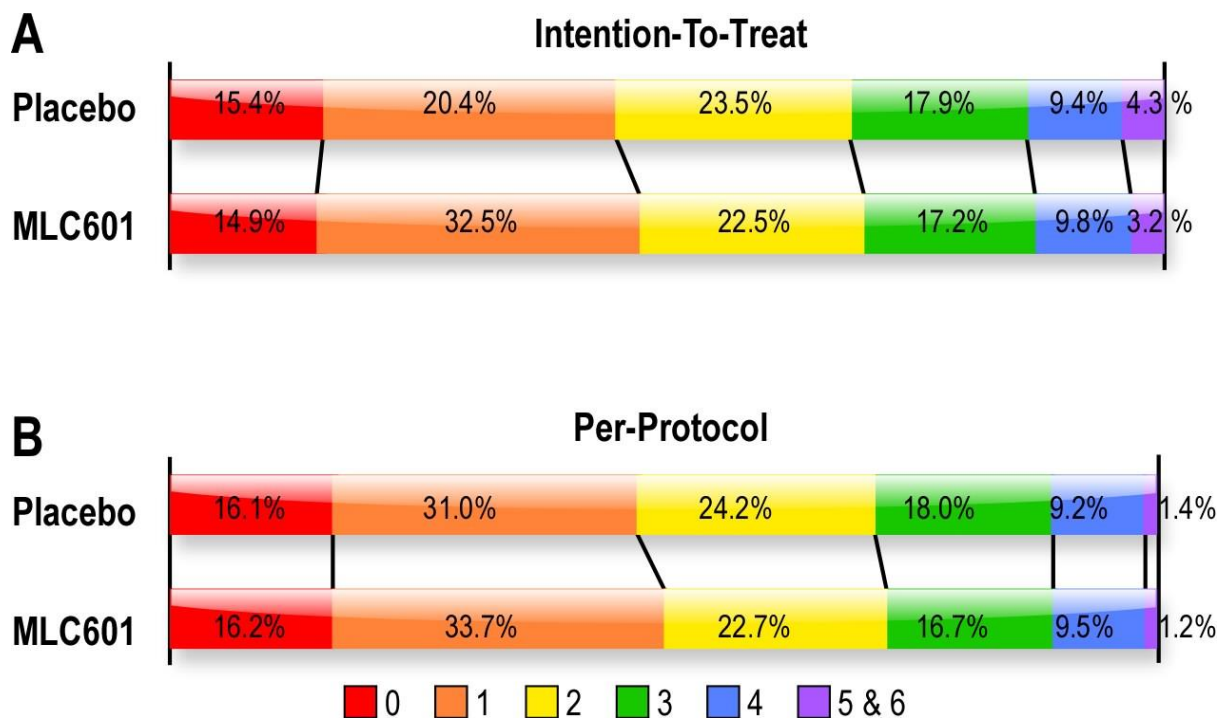


Figure 15: Comparaison du score de Rankin modifié entre le groupe Placebo et le groupe MLC601 (Chen et al.) avec et sans analyse des perdus de vue.

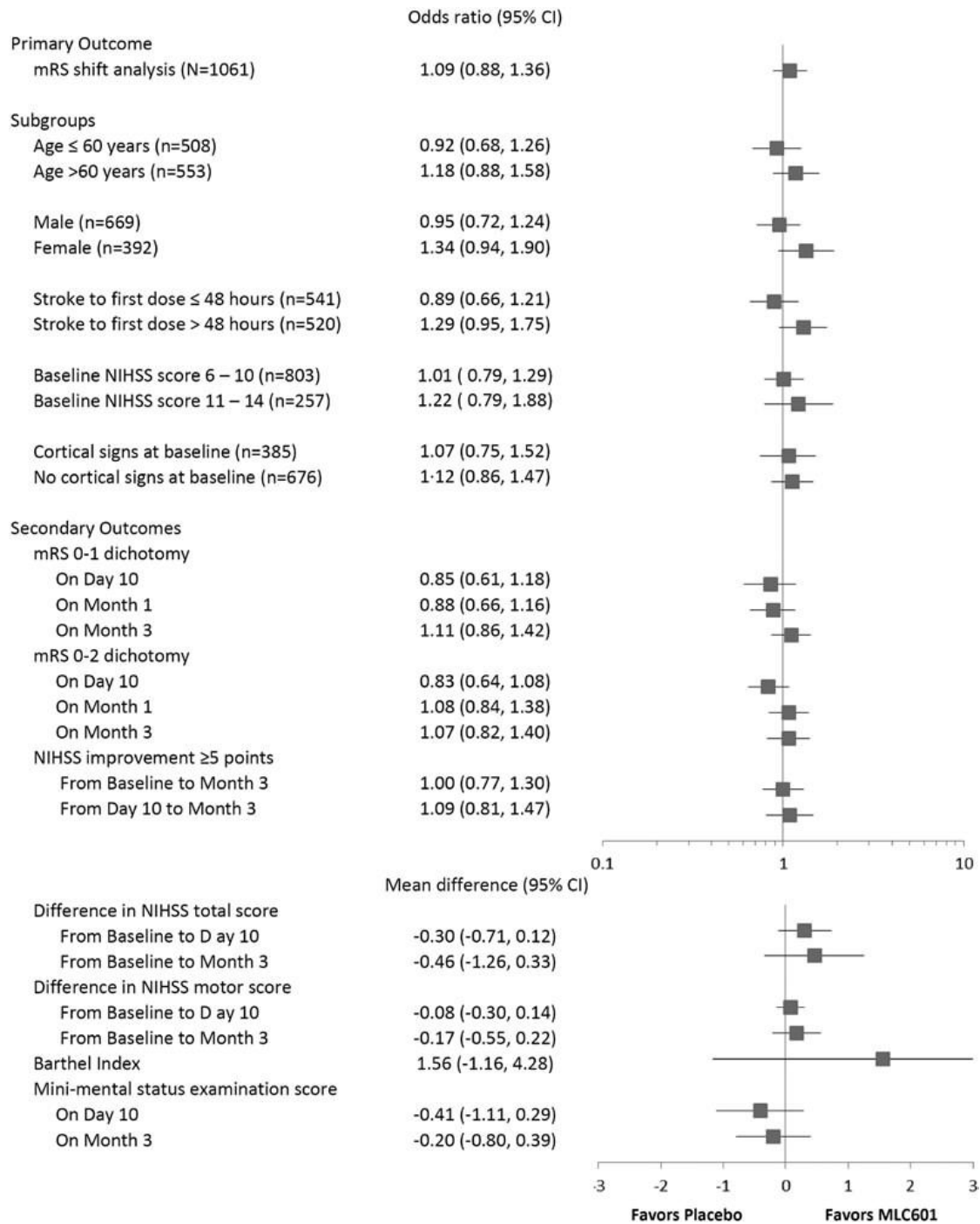


Figure 16: Comparaison des 2 groupes concernant les différents critères évalués (Chen et al.)

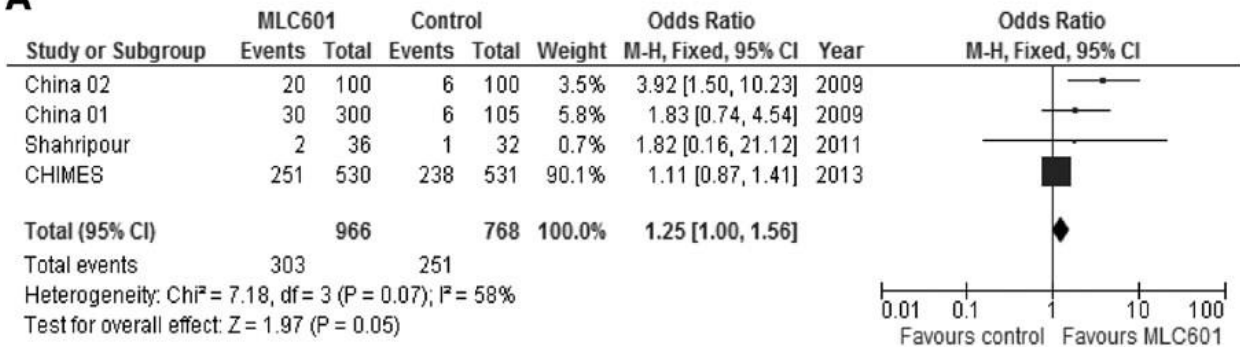
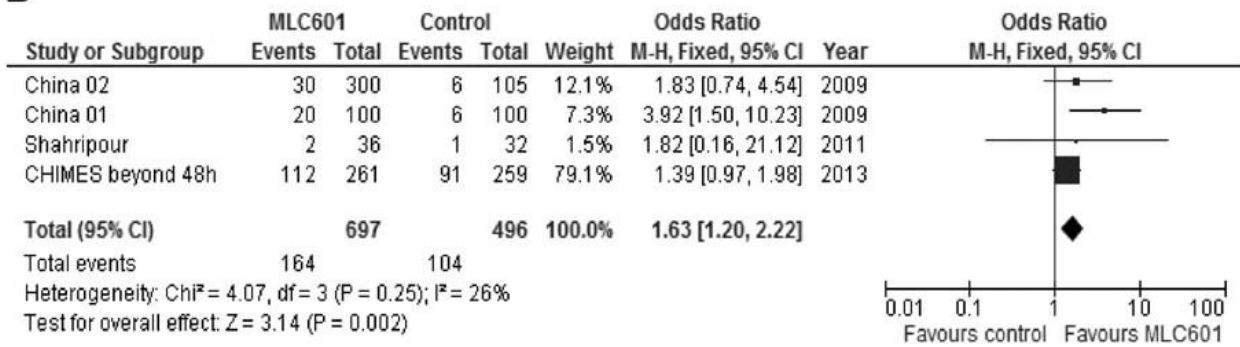
A**B**

Figure 17: Métaanalyse du pronostic fonctionnel à la fin de l'étude pour tous les patients(A) et les patients traités à > 48h (Chen et al.)

...aux études expérimentales

Des études de validation expérimentale du MLC601 et MLC901 dans le traitement de l'AVC, réalisées dans le laboratoire d'accueil ont démontré l'effet protecteur de ces deux traitements sur la taille de la lésion cérébrale dans un modèle d'ischémie focale mimant l'AVC chez la souris, ainsi que son effet sur les différents mécanismes neurogéniques et neuroprolifératifs (Heurteaux et al., 2010). En effet sur un modèle d'ischémie focale, par occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez la souris, on observe une diminution significative du volume de souffrance cérébrale chez les animaux traités par MLC601 en pré- (6mg/mL dans l'eau de boisson) ou post-ischémie (1µg/souris dans 500µL en intra péritonéal). Ces effets protecteurs sont associés à une augmentation de la neurogénèse dans le dentate gyrus. Ce produit a également été testé sur des modèles *in vitro* mimant l'ischémie, tels que la privation d'oxygène et de glucose (modèle OGD) pendant 2 heures ou l'application de glutamate mimant l'excitotoxicité sur des cultures de neurones corticaux qui induisent des dégâts cellulaires importants : œdème cellulaire, augmentation de l'influx cellulaire en calcium $[Ca]_i$, dégénération neuronale, relargage de lactate déshydrogénase, marqueur de souffrance cellulaire. Le MLC901, utilisé dans ce contexte semble limiter l'influx en Ca^{2+} , et avoir une action anti-glutamate (Figure 18) (Moha Ou Maati et al., 2012).

Cette action est en rapport avec une hyperpolarisation secondaire à l'ouverture de canaux potassiques sensibles à l'ATP (K_{ATP}). Ceci a pu être mis en évidence par l'utilisation d'agoniste et d'antagoniste des canaux K_{ATP} (pinacidil et glibenclamide) (Figure 19). Par contre, les canaux potassiques à deux domaines Pore tels que (TREK-1, TRAAK, TRESK,...), également impliqués dans les mécanismes de neuroprotection, ne sont pas activés par le MLC901 (Figure 20).

Outre ces mécanismes neuroprotecteurs, le MLC901 a également un effet neurorégénérateur, avec une prolifération des cellules immatures développées au niveau des niches sous-ventriculaires et sous- gyrales. Le MLC901 favorise la multiplication neuronale, la synaptogénèse ainsi que la croissance neuronale. En effet des cultures de neurones en présence de MLC901 ont montré une densification des réseaux axonaux et d'arborisations dendritiques avec développement de nouvelles synapses. Cette activation semble être en rapport avec une augmentation de l'expression de BDNF (Figure 21) (Heurteaux et al., 2010).

Il semble que le NeuroAid puisse avoir également un effet sur les dépôts amyloïdes retrouvés au cours de démences vasculaires, comme récemment montré dans les travaux de Lim (Lim et al., 2013).

L'ensemble des études précliniques montrant les actions neuroprotectrices et neurorégénératives du MLC901 dans les deux modèles d'ischémie focale et globale et dans les modèles in vitro a été récemment publiée dans une revue de la littérature (Heurteaux et al., 2013) qui est intégrée dans ce manuscrit (Annexes)

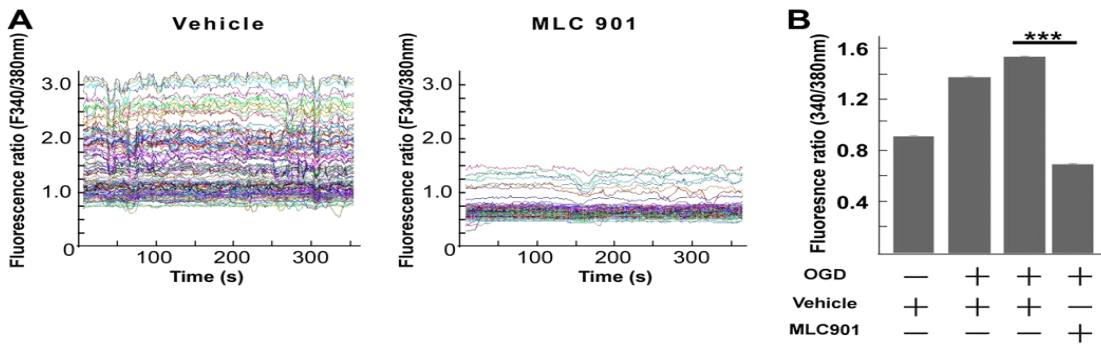


Figure 18: Inhibition de l'onde calcique induite par la privation en oxygene et en glucose par le MLC901 (Moha Ou Maati et al.)

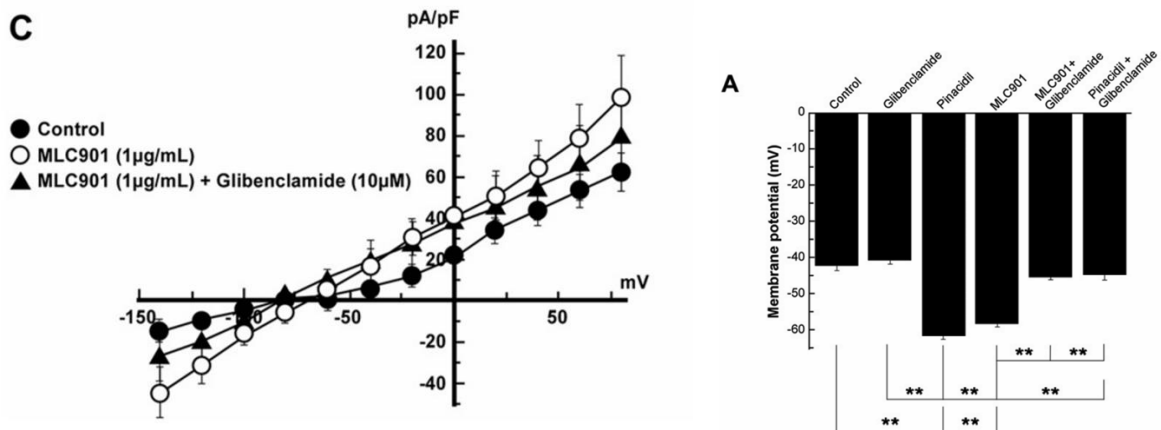


Figure 19: Potentiel de membrane de neurones corticaux en présence d'un milieu contrôlé, un milieu contenant du MLC901 et un milieu enrichi en MLC901 et antagoniste des canaux KATP (Glibenclamide) (Moha Ou Maati et al.)

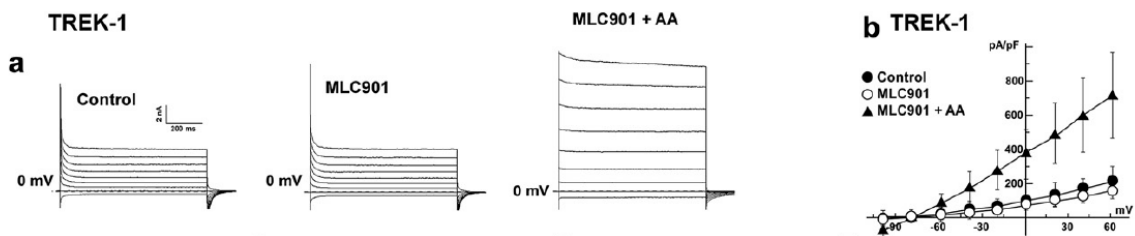


Figure 20: Absence d'effet du MLC901 sur les courants potassiques TREK-1, dans des neurones corticaux de souris (AA : Acide Arachidonique) (Moha Ou Maati et al.)

MLC601 et MLC901 stimulent la plasticité cérébrale

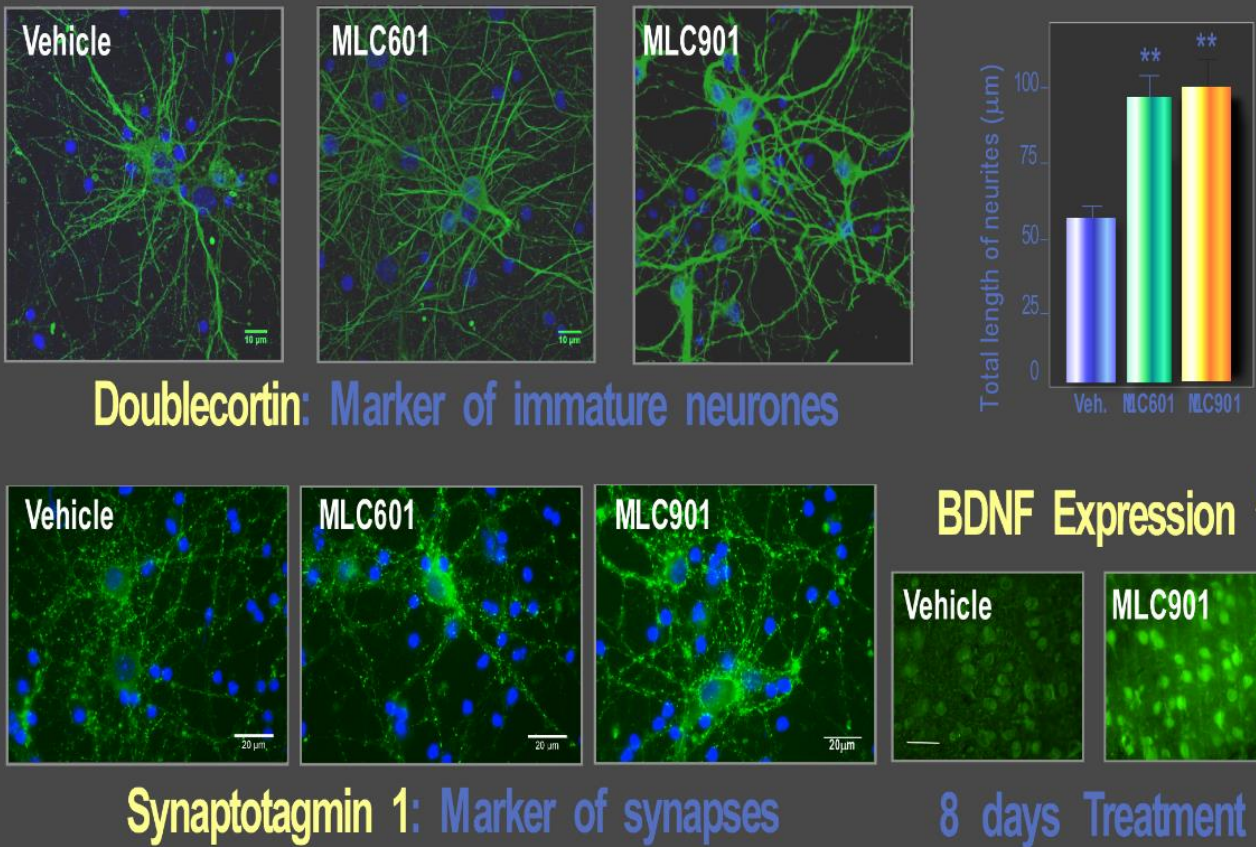


Figure 21: Prolifération neuronale et synaptique sous MLC601 et 901 sur une culture de neurones corticaux de souris. Cette activation est associée à une augmentation du taux de BDNF.

**EVALUATION DE L'EFFET DU MLC901 SUR
UN MODELE D'ISCHEMIE GLOBALE**

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Les données recueillies sur l'ischémie focale, nous ont conduits à nous intéresser à l'effet du MLC901 sur d'autres modèles animaux. Le premier objectif de ma thèse a donc été de s'intéresser à un autre modèle de souffrance cérébrale, l'ischémie globale, se rapprochant des conséquences liées à un arrêt cardio-circulatoire chez l'humain, par l'ischémie reperfusion induite. L'objet était d'évaluer les propriétés potentiellement neuroprotectrices du MLC901, dans ce contexte. Nous voulions également comprendre les mécanismes d'action du MLC901 en regard de la prolifération cellulaire et de la neurogénèse.

MATERIEL ET METHODES

Nous détaillerons ici le protocole général de l'étude, les moyens d'approche spécifiques aux hypothèses posées seront donnés lors de l'analyse des résultats.

Animaux

Toutes les expériences ont été menées conformément à la charte nationale éthique d'expérimentation animale disponible sur le site de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire : www.ipmc.cnrs.fr. Tous les efforts ont été faits pour minimiser le nombre d'animaux utilisés et leur souffrance. Les animaux utilisés pour cette étude sont des rats males Wistar (250 g) provenant du centre d'élevage de Charles River Laboratories (France). Immédiatement après leur arrivée au laboratoire, les rats sont placés par deux dans des cages standardisées (42x29x15 cm) et hébergés dans une animalerie maintenue dans des conditions de température ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) et d'humidité constantes ($55 \pm 10\%$). Le cycle d'éclairage est

inversé (12h de nuit, 12 h de jour). Les animaux ont un libre accès à l'eau et à la nourriture.

Modèle d'ischémie globale chez le rat

L'ischémie télencéphalique globale, est induite de manière transitoire suivant le modèle "4 vaisseaux" (Figure 22) (Pulsinelli and Brierley, 1979). Ce modèle consiste en la cautérisation sous anesthésie générale par Isoflurane Vétérinaire Belamont (Fraction inspirée 2% en air) des artères vertébrales. Après 24 heures de récupération une occlusion transitoire (20 min) des troncs carotidiens est réalisée par clampage des 2 carotides chez le rat éveillé. La perte du réflexe de redressement et la réduction du débit sanguin cérébral analysée par Laser-Doppler sont les critères reflétant le succès de l'acte chirurgical.

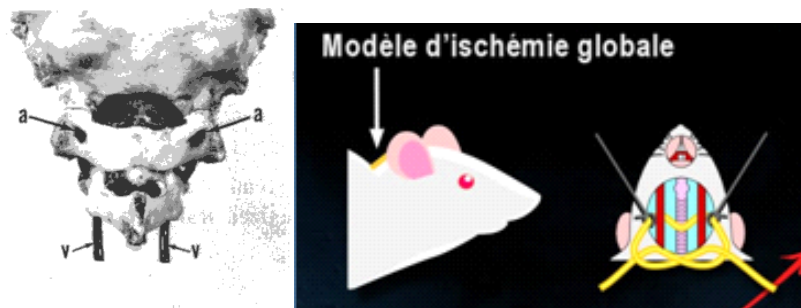


Figure 22: Modèle d'ischémie globale décrit par Pulsinelli et al. (1979)

Un délai de 3 ou 7 jours, est alors respecté pendant lequel l'animal reçoit le traitement à tester ou le placebo avant sacrifice. Les cerveaux des animaux sacrifiés sont prélevés selon différents protocoles histologiques dépendant du type d'expériences mises en place:

-*Coupe à congélation* : Après anesthésie générale par inhalation d'Isoflurane, les animaux sont guillotisés avec récupération des cerveaux congelés à -40°C dans de l'isopentane et conservés à -20°C. Les cerveaux sont ensuite coupés par utilisation d'un microtome permettant de recueillir des coupes coronales de 20µm.

-*Coupes flottantes*: Après anesthésie générale par inhalation d'Isoflurane, les animaux sont perfusés par une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 20mn. Les cerveaux sont prélevés et conservés dans du paraformaldéhyde à -20°C pendant 24h. Les cerveaux sont ensuite coupés par utilisation d'un vibratome permettant de recueillir des coupes coronales de 40µm centrées sur l'hippocampe, qui seront conservées dans un milieu « anti-freeze » à -20°C.

- *Coupes à paraffine*: Après anesthésie générale par inhalation d'Isoflurane, les animaux sont perfusés par une solution de paraformaldéhyde 4% pendant 20mn. Les cerveaux sont prélevés et conservés dans du paraformaldéhyde à -20°C pendant 24h. Chaque cerveau est ensuite paraffiné grâce à un processeur de tissu SP120 (Microme France), permettant une immersion dans 1 bain d'alcool 70%, 1 bain alcool 90%, 2 bains alcool 100%, 3 bains de xylène et 3 bains de paraffine successifs d'une durée de 1h30 chacun. Les cerveaux sont ensuite coupés pour obtenir des sections coronales de 20µm sur un microtome à paraffine (Leica France). Le déparaffinage s'effectue par immersion dans des bains de xylène et d'alcool successifs.

Traitement utilisé

Le traitement utilisé NeuroAid (MLC901, Moleac Pte. Ltd, Singapore) est un composé de 9 éléments végétaux (Radix astragali, Radix Salviae mitorrhizae, Radix paeoniae rubra, Rhizoma chuanxiong, Radix angelicae sinensis, Carthamus tinctorius, Prunus persica, Radix polygalae and Rhizoma acori tatarinowii). Il se présente sous forme de poudre qui est diluée et filtrée pour permettre une injection par voie intrapéritonéale chez le rat. Une étude préliminaire pilote est réalisée afin de définir la dose optimale à utiliser par voie intrapéritonéale. En dehors de l'étude dose-effet, les rats sont répartis en 2 groupes : Placébo et traité par le MLC901. L'injection se fait par voie intrapéritonéale 30 minutes après la fin de l'ischémie et 1 fois par 24h pendant la durée de l'étude.

Analyse statistique : L'analyse statistique repose sur l'utilisation de tests non paramétriques. La comparaison des densités cellulaires s'effectuera par un test de Mann et Whitney. L'ensemble des comparaisons entre le groupe placebo et le groupe traité utilise les tests non paramétriques (Kruskall Wallis et Mann et Whitney)

RESULTATS

Etude Effet-Dose du MLC901

La première étape de notre analyse a été de définir la dose et la fenêtre thérapeutique optimale d'injection du produit. Afin de déterminer la concentration optimale, une étude effet-dose a été réalisée, à partir de concentrations décroissantes de MLC901 (74mg/ml, 7.4mg/ml, 0.74mg/ml, 0.074 mg/ml) sur l'étendue de la nécrose mesurée au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe à J7. La gamme des concentrations utilisées a été obtenue à partir des prescriptions utilisées chez l'homme dans les essais cliniques réalisés en Chine et en Asie du Sud Est. L'équivalent dose chez l'animal a été défini selon les données publiées par Reagan Shaw et al. (Reagan-Shaw et al., 2008):

$$\text{Dose équivalente animal} = (\text{Dose humaine} \times \text{Km Homme}) / \text{Km Animal}$$

$$\text{Km Homme} = 37$$

$$\text{Km Rat} = 6$$

L'analyse comparative de la souffrance de l'hippocampe au niveau de la zone CA1 a été réalisée par quantification cellulaire après coloration au Crésyl Violet à J7. Les rats inclus dans ce groupe sont répartis en 6 sous-groupes: 6 SHAM, 6 Placébo (Vehicle), 6 dans le groupe correspondant à la concentration de 74 mg/ml, 6 dans le groupe à la concentration de 7.4 mg/ml, 6 dans le groupe correspondant à la concentration de 0.74mg/ml et 6 dans le groupe correspondant à la concentration de 0.074 mg/ml. La mortalité respective dans chaque groupe 7 jours après l'ischémie était de 0% dans le groupe SHAM, 17% dans le groupe Placebo, 90% dans le groupe

74mg/ml, 40% dans le groupe 7,4mg/ml, 0% pour les groupes 0,74 mg/ml et 0,074mg/ml (Figure 23 A). La mortalité dans les groupes forte dose était essentiellement secondaire à la présence de convulsions généralisées répétées apparaissant dans les premières 72h suivant l'injection intrapéritonéale de produit. La densité moyenne neuronale au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe dans le groupe Placébo est de 115.7 cellules/mm vs 234.3 dans le groupe SHAM ($p<0.01$). On décrit une différence significative entre le groupe SHAM et le groupe 74mg/ml (234.2 vs 134.2 cellules/mm $p<0.01$). Il existe également une différence significative entre le groupe Placebo et le groupe 0,074mg/ml (115.7 cellules/mm vs 228.2 cellules/mm $p<0.01$) (Figure 23 B). Le taux de cellules survivantes passe de 24,5% dans le groupe Placebo à 84,5% dans le groupe 0,074mg/ml.

Une étude sur la fenêtre thérapeutique d'administration a également été réalisée sur le même principe. Nous avons réparti les animaux (5 animaux par groupe) entre 30 mn, 1 h, 2h, 3h et 6h. Le délai d'injection est optimal entre 30mn et 3h suivant l'ischémie (Figure 24).

Ces résultats montrent que **la dose utilisée de 0,074 mg/ml** injectée (1mL/rat) par **voie intrapéritonéale dans les 3h** après la fin de l'ischémie et une fois par 24h est la dose qui induit la meilleure protection neuronale. Cette dose est celle qui sera utilisée pour toutes les expériences suivantes.

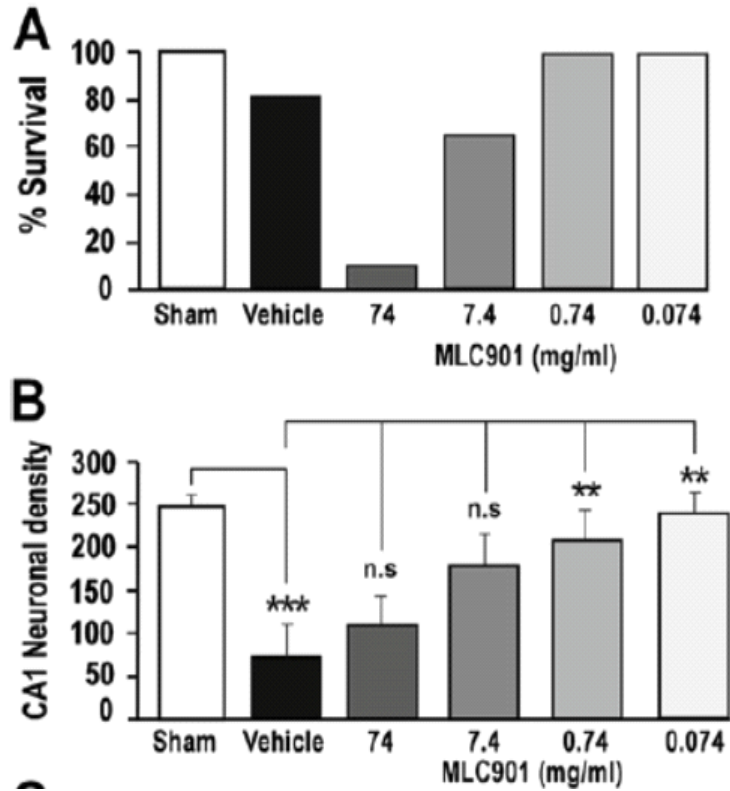


Figure 23: Pourcentage de survie (A) et densité neuronale moyenne (SEM) (B) dans le CA1 pour des concentrations décroissantes de NeuroAid. (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$)

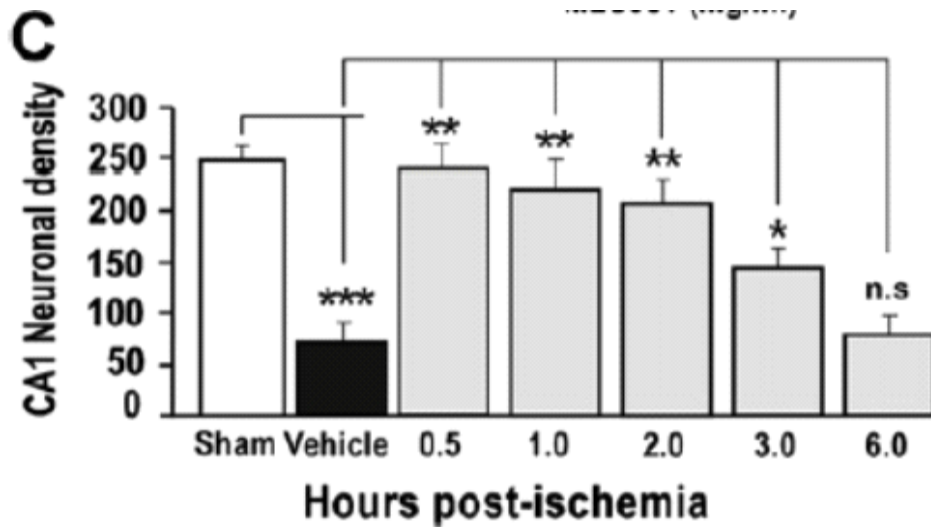


Figure 24: Fenêtre thérapeutique du MLC901: Densité neuronale moyenne (SEM) en fonction du délai d'administration (***) $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$)

Evaluation de l'effet neuroprotecteur du MLC901

Nécrose neuronale

Un des principaux mécanismes de dégénérescence post-ischémie est représenté par la nécrose cellulaire. Nous avons donc évalué l'impact de celle-ci par une étude histologique au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe. Les animaux étaient sacrifiés à J7 post-ischémie selon le protocole décrit pour les coupes à congélation. La coloration des différentes lames se fait par immersion successive dans une solution de Crésyl violet (5g de Cresyl violet pour 1 L d'H₂O), 2 bains d'H₂O distillée, 1 bain d'acide acétique. Les lames sont ensuite montées par de l'Entellan sous hotte. Le comptage neuronal s'effectue au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe, zone cérébrale la plus sensible à l'ischémie (Heurteaux et al., 1995). Le crésyl violet, du groupe des oxazines, permet de colorer les corps de Nissl des cellules en violet, permettant ainsi de mettre en évidence les cellules non lésées par nécrose. Trois coupes par cerveau centrées sur l'hippocampe au niveau de la zone CA1 sont sélectionnées. Le comptage cellulaire s'effectue alors grâce au logiciel ImageJ®. Les résultats sont rendus en nombre de cellules/mm². La mise en évidence de la dégénérescence neuronale est aussi réalisée par coloration au Fluo-Jade B, un dérivé polyanionique couplé à la fluoroscéine, qui spécifiquement et avec une excellente affinité se lie aux neurones en dégénérescence, nécrotiques et apoptotiques. Le marquage se fait selon le protocole décrit par Schmued et coll (Schmued et al., 1997).

L'importance de la nécrose cellulaire induite par l'ischémie a été étudiée sur 14 rats (6 Placébo, 4 SHAM, et 4 MLC901) 7 jours après l'ischémie. Le comptage cellulaire au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe, sur les coupes colorées au crésyl violet montre qu'il existe une différence significative entre les groupes Placébo et SHAM (115.7 cellules/mm vs 234.3, $p < 0.01$) et Placébo et MLC901 (115.7 cellules/mm vs 228.2 cellules/mm, $p < 0.01$). L'ischémie globale induit donc une importante

neurodégénérescence dans la région du CA1 de l'hippocampe et le traitement MLC901 (0.074 mg/ml) protège le cerveau des dommages neuronaux induits (Figure 25 images gauches). La protection neuronale par le MLC901 est confirmée par la coloration Fluoro-Jade B, qui montre un nombre réduit de neurones nécrotiques et apoptotiques dans le CA1 des cerveaux traités en comparaison du Placébo.

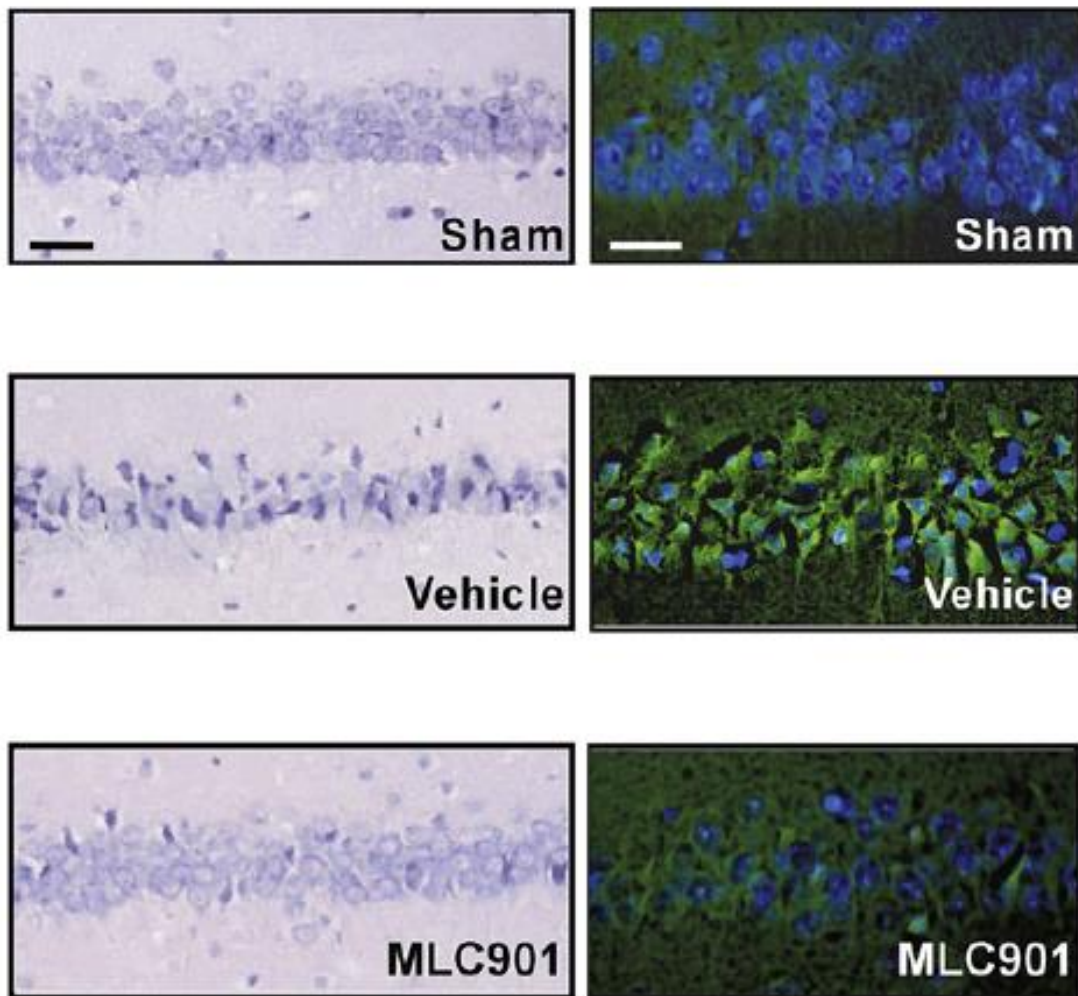


Fig 25: Effet neuroprotecteur du MLC901 au niveau du CA1 de rats ayant subi une ischémie globale et analysés après 7 jours de reperfusion par coloration au Crésyl violet (20X)

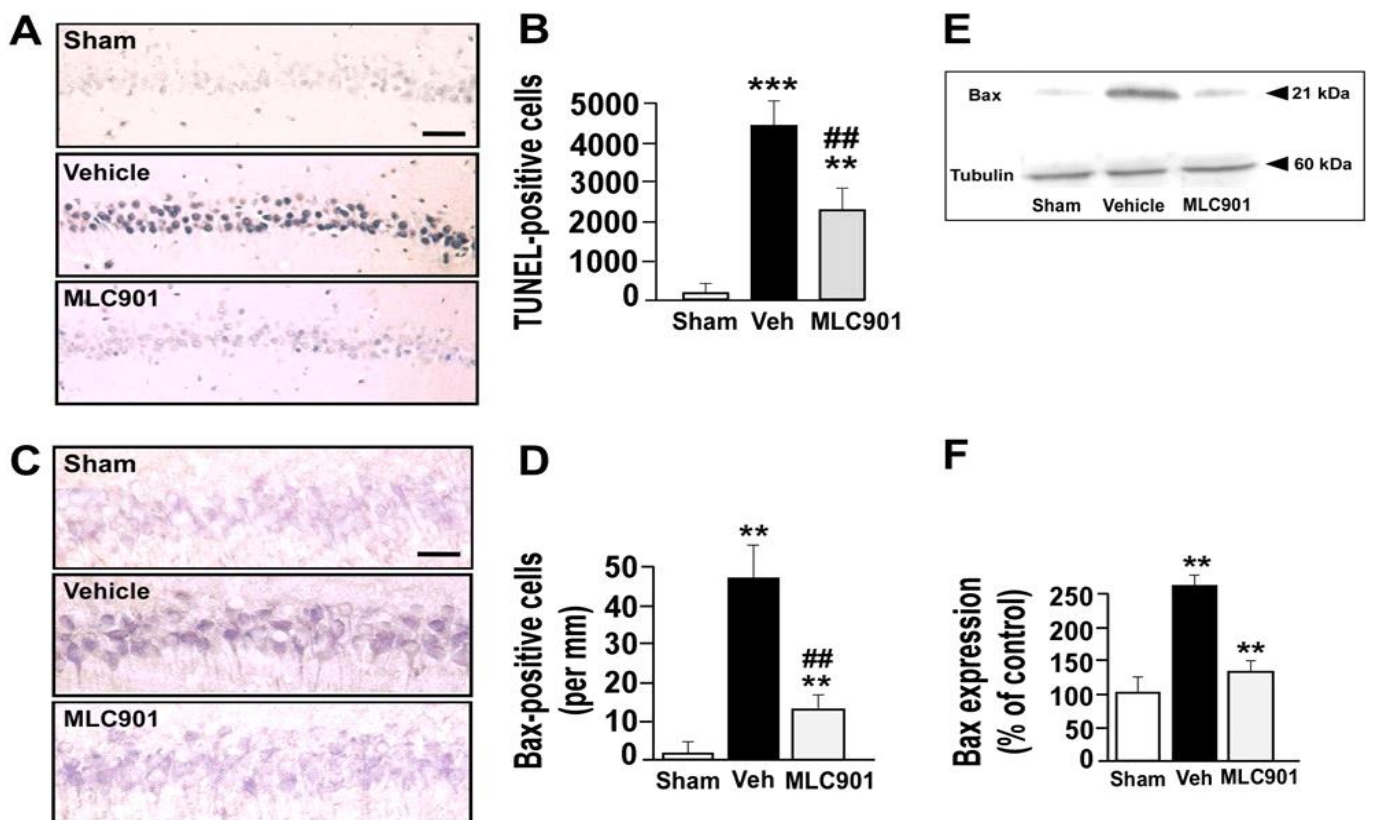
Apoptose

Comme nous l'avons vu l'autre mécanisme de dégénérescence cellulaire post-ischémie est apoptotique. Celle-ci a été approchée histologiquement par marquage TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase d'UTP Nick End Labelling). Cette méthode repose sur le principe que les cellules apoptotiques voient leur ADN clivé par des nucléases. Cette dégradation génère des 3' OH libres qui sont reconnus par la transférase, qui va leur ajouter un dUTP biotinylé ou marqué avec un fluorochrome.

Les animaux sont sacrifiés à 72h post- ischémie selon le protocole des coupes à paraffine. Après déparaffinage, les lames sont lavées dans le PBS, inactivation des peroxydases endogènes par H₂O₂ et perméabilisées dans du Tween 0,3%. Marquage par biotinylation grâce à la déoxynucleotidyl transférase en chambre humide à 37°C pendant 1h, avant 3 rinçages par PBS. Incubation avec l'horseradish peroxydase pendant 30mn en chambre humide. Coloration par 0.05% diaminobenzidine (DAB) pendant 5 à 10mn à température ambiante. Une quantification cellulaire est ensuite réalisée au microscope (nombre de coupes/cerveau, n=6 par groupe expérimental).

A J3 de reperfusion, on note au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe, la présence de cellules en apoptose, visualisée par un marquage des cellules apoptotiques en noir. L'administration du MLC901 diminue significativement au niveau de la zone

CA1 de l'hippocampe le nombre de cellules en apoptose comme le démontre la diminution du marquage TUNEL dans la zone CA1 (Figure 26 A-B). On observe une diminution significative du marquage TUNEL de 49,5% dans le groupe traité MLC901.



*Fig 26: Effet du MLC901 sur l'apoptose induite par l'ischémie globale 3 jours post-ischémie dans le CA1. (A) Marquage TUNEL des cellules apoptotiques; (B) Quantification moyenne (SEM) du marquage cellulaire Tunel par hippocampe au niveau du CA1 (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ vs SHAM ; ## $p < 0,01$ vs Vehicle) ; (C) Expression immunohistochimique de Bax dans le CA1; (D) Quantification moyenne(SEM) par mm de Bax en immunohistochimie (** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ vs SHAM ; ## $p < 0,01$ vs Vehicle) ; (E) Expression de Bax par Western Blot; (F) Quantification moyenne(SEM) de Bax par Western Blot par rapport au SHAM (** $p < 0,01$ vs SHAM)*

Le dimère Bax/Bax, de la famille Bcl2 est un promoteur apoptotique, sous la dépendance de p53. L'augmentation de son expression par rapport à Bcl2/Bcl2 induit la bascule vers des mécanismes pro apoptotiques. L'étude de Bax permet d'étudier la voie intrinsèque de l'apoptose. L'homodimère de Bax se fixe à la membrane externe mitochondriale. Cette fixation entraîne une perforation de la membrane mitochondriale et un relargage de cytochrome C dans le cytosol. Ceci entraîne une modification du potentiel membranaire mitochondrial, ainsi qu'une perturbation de la chaîne respiratoire (Figure 27). Nous nous sommes intéressés à l'expression de Bax au décours de l'ischémie globale sur notre modèle. Les animaux (6 animaux par groupes) étaient sacrifiés à 72h post-ischémie selon protocole antérieurement étudié (Heurteaux et al., 2010). Après déparaffinage, les lames étaient lavées dans le PBS. Perméabilisation au Tween 0,3% puis incubation en chambre humide à température ambiante avec le sérum de chèvre. Ajout de l'anticorps primaire Bax (dilution 1/100, TEBU Santa Cruz) sur une nuit à 4°C. Rinçage des lames par PBS. Ajout de l'anticorps secondaire pendant 1 h à température ambiante. Coloration Hoecht, montage au fluoroprep et comptage cellulaire au microscope optique.

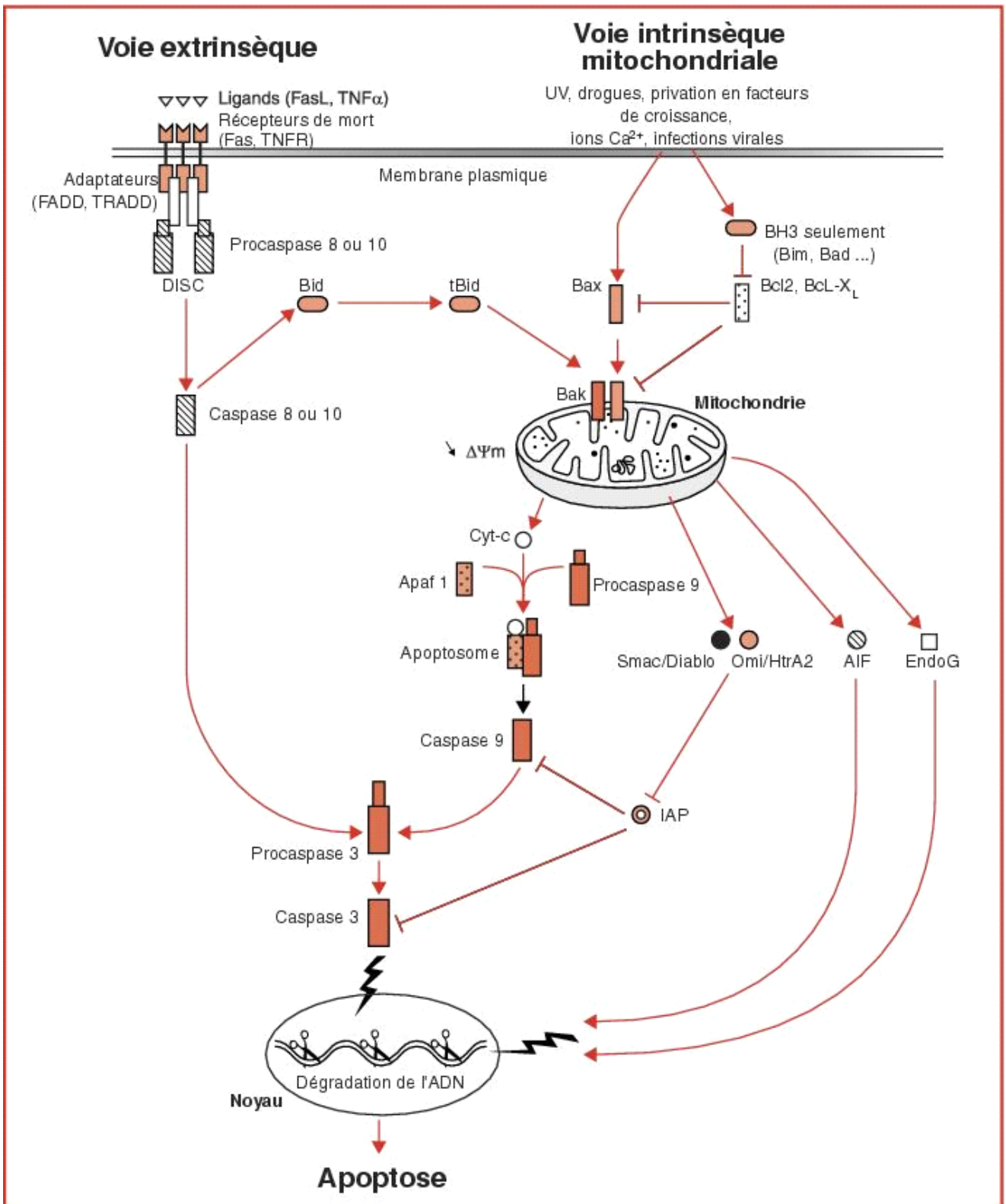


Figure 27: Voies de signalisation de l'apoptose

Le marquage par immunofluorescence de Bax, molécule pro apoptotique, réalisée 3 jours après l'ischémie, met en évidence une diminution significative (1,93x) du nombre de cellules marquées dans la région CA1 du groupe traité par le MLC 901 ($p < 0,03$, $n=6$ par groupe expérimental). Ces résultats suggèrent que le MLC901 diminue significativement l'induction de l'apoptose par Bax observée 3 jours après l'ischémie dans le groupe Placébo. Ces données ont été également confirmées par la technique de Western Blot avec une diminution de l'expression de Bax au niveau des protéines hippocampiques (Figure 26 C-F).

L'apoptose est soumise à des mécanismes de contre régulation. Un des mécanismes impliqué dans la survie neuronale suite à une ischémie est la voie PI3K/Akt (Franke et al., 1995) connue pour être impliquées dans les mécanismes de survie neuronale et d'inhibition de l'apoptose (Yano et al., 2001). Akt activée bloque l'apoptose par phosphorylation de ses substrats, tels que Bad, le facteur de transcription Forkhead (FKHR) et la glycogène synthétase kinase 3 (GSK3). L'activation complète d'Akt requiert 2 étapes: Phosphorylation d'Akt au niveau de la Thréonine- 308 (Thr-308) suivie de la phosphorylation d'Akt au site Sérine-473. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'effet du traitement MLC901 sur l'induction de la voie Akt. Nous avons analysé par *immunohistochimie* la phosphorylation pAkt (Ser-473). Après déparaffinage les lames sont lavées dans le PBS. Perméabilisation au Tween 0,3% puis incubation en chambre humide à température ambiante avec le Goat serum. Ajout de l'anticorps primaire (dilution 1/100, Cell Signaling) sur une nuit à 4°C. Rinçage des lames par PBS. Ajout de l'anticorps secondaire pendant 1 h à température ambiante. Montage au Fluoroprep pendant 1h et comptage au microscope.

Une analyse par *Western Blot* est également conduite après extraction protéique des cerveaux de rats. Après anesthésie générale par inhalation d'Isoflurane, à 8h post ischémie, les animaux ($n=4$ par groupe) sont guillotins et les 2 hippocampes et le cortex sont prélevés sur glace. Ils sont conservés dans une

solution de 200µL contenant 1M Tris Cl pH4, EDTA, Glycérol 5%, Triton 0,1%, un inhibiteur phosphatase, 1M Benzamidine, inhibiteur protéique. Les broyats sont ensuite centrifugés à 3000 G pendant 10mn. Le surnageant est ensuite récupéré et stocké à -20°C dans le bleu de bromophénol, le tampon H6 et beta mercaptoéthanol jusqu'à son utilisation. Le dosage protéique est réalisé par la technique de Bradford. 50 µg de protéines sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide 8%. L'électrophorèse s'effectue durant 2 heures à 90 mA. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane (Hybond-P PVDF, Amersham Biosciences) dans du tampon de transfert (156 mmol/L Tris, 1 mol/L glycine, PBS) durant 90 minutes à 80 mA. La membrane est saturée pendant 1 heure à température ambiante dans 4% lait écrémé (Régilait)/ PBS. Puis une incubation est réalisée avec l'anticorps primaire PI3k/Akt et pAkt (dilution 1/250) pendant la nuit à 4° C. Après 4 lavages de 15 minutes dans du 0.1% Tween/PBS, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (anti-lapin couplé à la peroxydase, 1/10 000ème) 2 heures à température ambiante. La membrane est de nouveau lavée 4 fois 15 minutes dans du 0,1% Tween/PBS puis la détection des protéines d'intérêt se fait grâce au kit "ECL plus Western blotting detection reagents" (Amersham Biosciences) et visualisation *via* le système LAS-3000. Après déshybridation de la membrane, un second marquage avec l'anticorps anti- α -tubuline (dilution 1/500; Sigma-Aldrich), selon le même protocole que précédemment, permet de quantifier la quantité relative des protéines de chaque échantillon (la tubuline étant exprimées de manière homogène dans les différents types cellulaires).

Huit heures après l'ischémie, on observe une augmentation significative de l'expression d'Akt chez les animaux Placebo. Le Western blot, à partir d'extraits protéiques d'hippocampes et sa quantification montre que l'expression de pAkt (bande à 60 kDa) est significativement plus importante dans le groupe MLC901 (2,25x) que dans le groupe Placebo (Figure 28 A). La phosphorylation d'Akt est mesurée en normalisant les densités de pAkt (Ser-473) par rapport à la concentration d'Akt total. On observe une augmentation de l'activation pAkt (Ser-473) dans le

groupe traité par MLC901 par rapport au groupe Placebo. ($p < 0.05$). Cet effet est inhibé par l'utilisation d'un antagoniste d'Akt, LY294002. L'immunohistochimie confirme les résultats du Western blot. Trois jours après l'ischémie, on observe une forte expression de pAkt (Ser-473) dans les neurones vulnérables à l'ischémie de la région CA1 de l'hippocampe. Le MLC901 augmente fortement les niveaux de pAkt (Ser-473), suggérant une implication de la voie Akt dans la protection induite par le MLC901.

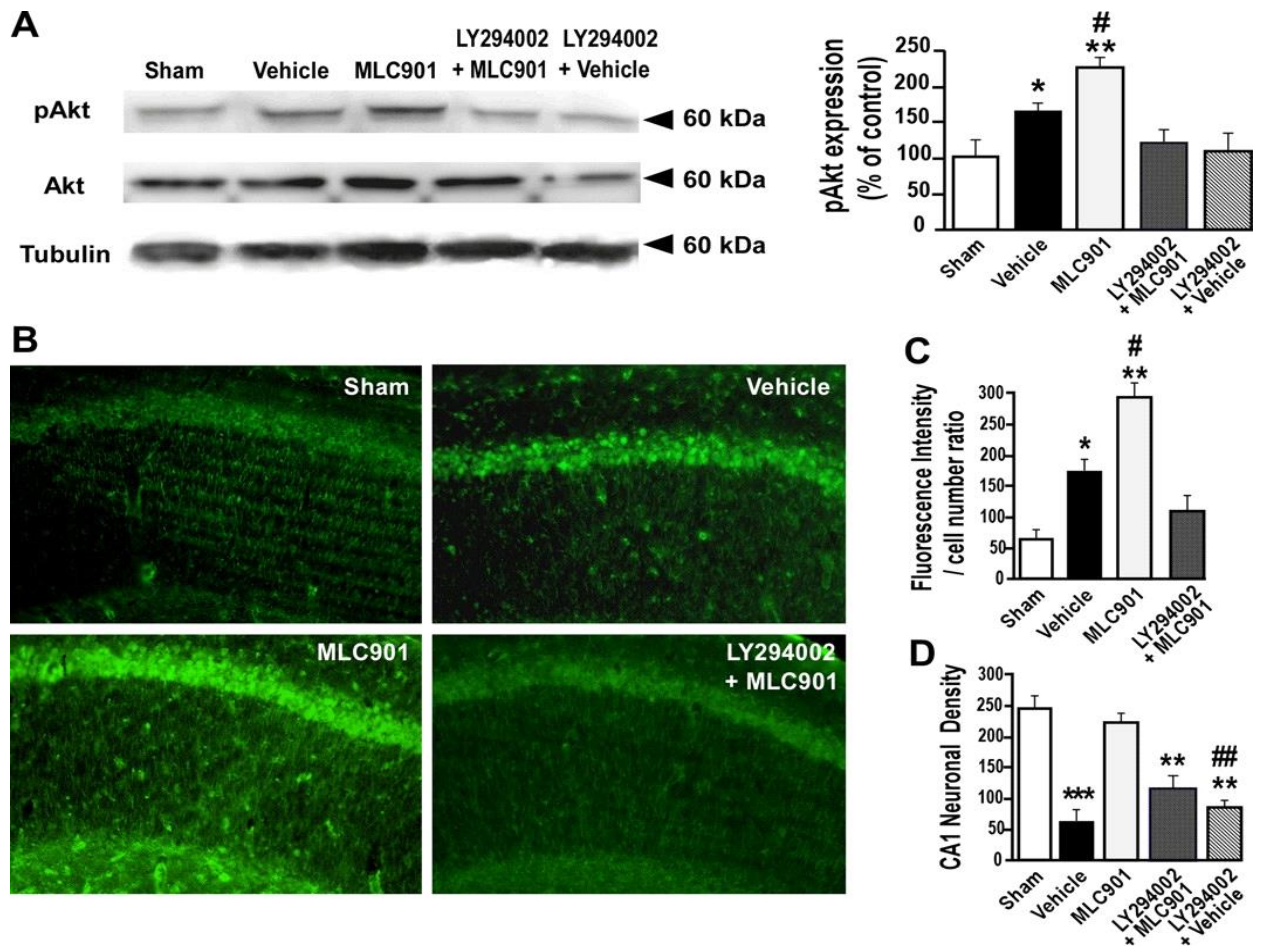


Figure 28: Effet du MLC901 sur la voie de signalisation Akt.

(A) Western Blot et Quantification moyenne (SEM) de pAkt mesurée à 8h post ischémie (* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ vs SHAM. # $p < 0,05$ vs vehicle) $n = 4$ par groupe. (B) Immunomarquage pAkt au niveau du CA1 en photomicroscopie chez SHAM, Vehicle, traités MLC901 et traité MLC901+LY294002 (C). Quantification moyenne (SEM) de l'intensité du marquage pAkt au niveau du CA1 dans les 4 groupes (* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ vs SHAM ; # $p < 0,05$ vs Vehicle). (D) Histogrammes représentant la densité neuronale dans le CA1 après l'injection du LY294002 analysée 7 jours après reperfusion (** $p < 0,001$ et ** $p < 0,01$ vs SHAM ; ## $p < 0,01$ vs traité par MLC901) ($n = 6$ par groupe)

Stress oxydant

Le modèle d'ischémie globale est un modèle typique d'ischémie reperfusion. Le stress oxydatif est une agression des cellules par des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou l'oxyde nitrique. Le stress oxydatif est dû à un déséquilibre entre la production de radicaux libres et la capacité anti-oxydante de la cellule. Cette régulation est assurée par des enzymes telles que la superoxyde dismutase, la catalase ou la glutathion peroxydase. En cas d'ischémie puis de reperfusion, ces mécanismes régulateurs sont submergés, conduisant à une accumulation de radicaux libres créant des dégâts neuronaux. Suite à une ischémie, il y a accumulation en acide lactique qui enrichit le milieu en protons qui favorise la conversion de l'anion superoxyde (O_2^-) en radical peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), très réactif qui capte un électron de fer réduit et se scinde en 2, formant un anion hydroxyle et un radical OH. C'est la réaction d'Haber-Weiss/Fenton. Cette cascade de réaction entraîne la peroxydation des lipides. Nous nous sommes intéressés à cette peroxydation lipidique 4 heures après l'ischémie, témoin de l'importance du stress oxydatif induit, par mesure de la concentration en malondialdéhyde (MDA) dans les tissus hippocampiques par technique de fluorescence (Lipid Peroxidation Kit, EuroMedex) (Nguemini et al., 2010). La concentration de protéines a été déterminée suivant la méthode de Bradford. Après extraction protéique selon protocole spécifié par le fabricant et homogénéisation en tampon phosphate, le matériel hippocampique est centrifugé pendant 30mn à 3000 tours/mn, à 4 °C (n=6 par groupes). Trois milligrammes d'échantillon issu de chaque groupe expérimental sont incubés avec la N-méthyl-2-phénylindol, à 45°C pendant 45mn. Ce composé réagit avec le MDA présent dans les extraits protéiques pour donner un chromophore stable dont l'absorbance est déterminée à 532 nm.

Les animaux Vehicle ont des taux de MDA 5,5 fois supérieurs à de ceux des animaux SHAM. Un traitement par le MLC901 limite le pic de ce marqueur ($p < 0,01$) (Figure 29).

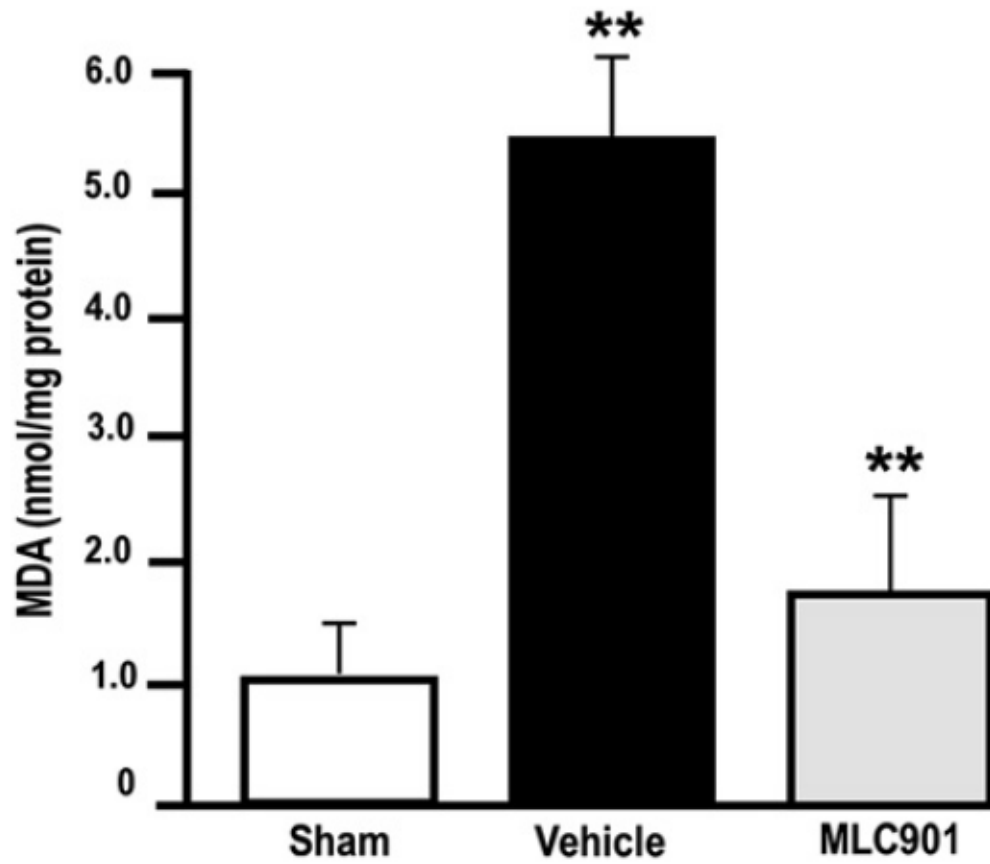


Figure 29: Effet du MLC901 sur la Concentration de MDA dans l'hippocampe après 4 heures de reperfusion (mean (SEM) ** $p < 0,01$ vs SHAM)

Effet neurorégénérateur du MLC901

Comme il a été montré par les résultats précédents, une ischémie globale entraîne des dommages neuronaux dans la zone CA1 de l'hippocampe. Une réparation de la zone lésée peut être possible par activation de cellules souches endogènes. Comme nous l'avons décrit précédemment on observe une augmentation de la prolifération de cellules précurseurs au niveau de la zone subgranulaire (SGZ) du dentate gyrus de l'hippocampe après ischémie (Eriksson et al., 1998). Le BrdU ou 5-bromo-2-deoxyuridine est un analogue nucléosidique de la thymidine, qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en prolifération. Afin de détecter la prolifération cellulaire au niveau du Dentate Gyrus dans les suites d'une ischémie globale, 4 injections de BromodesoxyUridine (BrdU), une base modifiée qui va remplacer la thymidine de l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire, ont été injectées selon le protocole modifié de Juan Beauquis (Beauquis et al., 2006) à J6 post-ischémie. Ces injections sont faites en intrapéritonéale à raison de 75mg/kg par animal en 4 injections espacées de 2h (n=6 par groupe). Le cerveau des animaux est prélevé le lendemain de la dernière injection du BrdU soit à J7, soit à J21 post-ischémie. Une immunohistochimie est réalisée toutes les 6 coupes d'hippocampe en utilisant un anticorps monoclonal anti-BrdU (1/200; BD Biosciences, Le pont de Claix, France). Les coupes sont incubées 1 heure dans un anticorps secondaire Anti Mouse biotinylé (1/100, Vector Laboratories), puis une peroxydation par le kit fourni par le fabricant est réalisée. L'activité peroxydasique est visualisée après marquage DAB. Les cellules marquées des zones granulaires et sous-granulaires sont comptées sous microscope optique. La technique de double marquage par Dcx (Double Cortine) protéine associée aux microtubules des somas des neurones en migrations ou dans les axones des neurones en différenciation, par NeuN, exprimé dans les neurones matures, et par GFAP, protéine gliale permettait de distinguer à J21 les phénotypes de différenciation.

L'étude de la prolifération cellulaire à J7 et J21 post-ischémie par marquage BrDU permet de mettre en évidence une augmentation du nombre de cellules immatures identifiées par un marquage BrdU, localisée dans le dentate gyrus. L'augmentation chez les animaux Vehicle est d'un facteur 4. Cette prolifération est significativement plus importante chez les animaux ischémiés traités par MLC901 (2990 vs 5900 cellules ; $p < 0.03$) (Figure 30). A J21, l'augmentation du nombre de cellules immatures persiste significativement chez les animaux traités par rapport aux Vehicle (1200 vs 4200 cellules ; $p < 0,05$). Le double marquage par NeuN met en évidence que 60% des cellules immatures ont un phénotype neuronal dans les 3 groupes. On ne retrouve pas de marquage GFAP à J21.

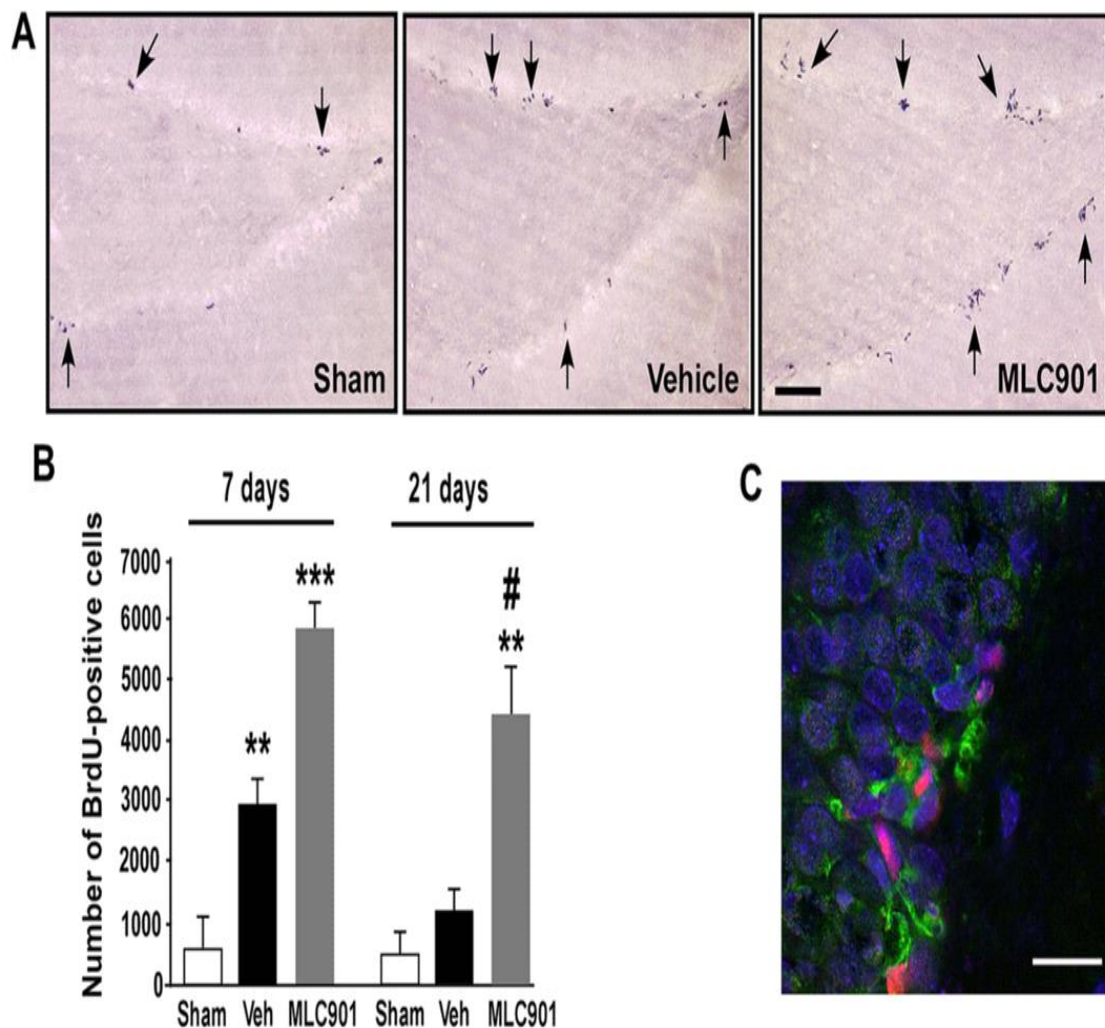


Figure 30: Effet stimulateur du MLC901 sur la neurogénèse.

(A) Photos montrant les cellules BrdU-positives au niveau du dentate gyrus après 7 jours de reperfusion. (B) Quantification moyenne (SEM) des cellules BrdU-positives au niveau du DG   J7 et J21, 8 coupes par groupe et 10 champs aléatoires par section (** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ vs SHAM et # $p < 0,05$ vs Vehicle) et (C) Double marquage neuronal BrdU/DCX (marqueur neuronal) après 7 jours de reperfusion.

Récupération fonctionnelle par l'utilisation de tests comportementaux

Les travaux réalisés sur le modèle d'ischémie focale avaient montré une amélioration de la récupération fonctionnelle des souris traitées par le MLC601 sur un test de Rotarod. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet fonctionnel du traitement sur notre modèle d'ischémie globale. Pour cela nous avons analysé la survie, la récupération motrice, et les troubles cognitifs des animaux grâce à une batterie de tests adaptés à ce type d'évaluation: "grip strength" test, actimétrie et piscine de Morris.

Grip strength test (BIOSEB)

La force de traction (g) d'un animal est enregistrée avec le système électronique Bioseb® (Figure 31). Après étalonnage, l'animal est positionné sur une grille reliée au capteur sur ses 4 pattes, puis une force de traction horizontale par la queue de l'animal est réalisée jusqu'à ce que celui-ci lâche la grille. La force de traction de l'animal est enregistrée en continu durant la manœuvre. L'activité de tension sur la barre du test d'agrippement a été mesurée 1 jour avant l'ischémie (BASE), puis à J3, J10 et J15 après l'ischémie. Les forces maximales sont exprimées en g. A l'état de base, il n'existe pas de différence significative entre les groupes. Dès J3, on note une diminution significative de la force motrice dans le groupe Placebo par rapport au groupe SHAM, qui persiste jusqu'à J15. Les animaux du groupe traité par le MLC901 ont une force de traction comparable aux animaux témoins à J3 et significativement supérieure au groupe Placebo dès J10 et jusqu'à J15 (Figure 32).



Fig 31: Grip strength test

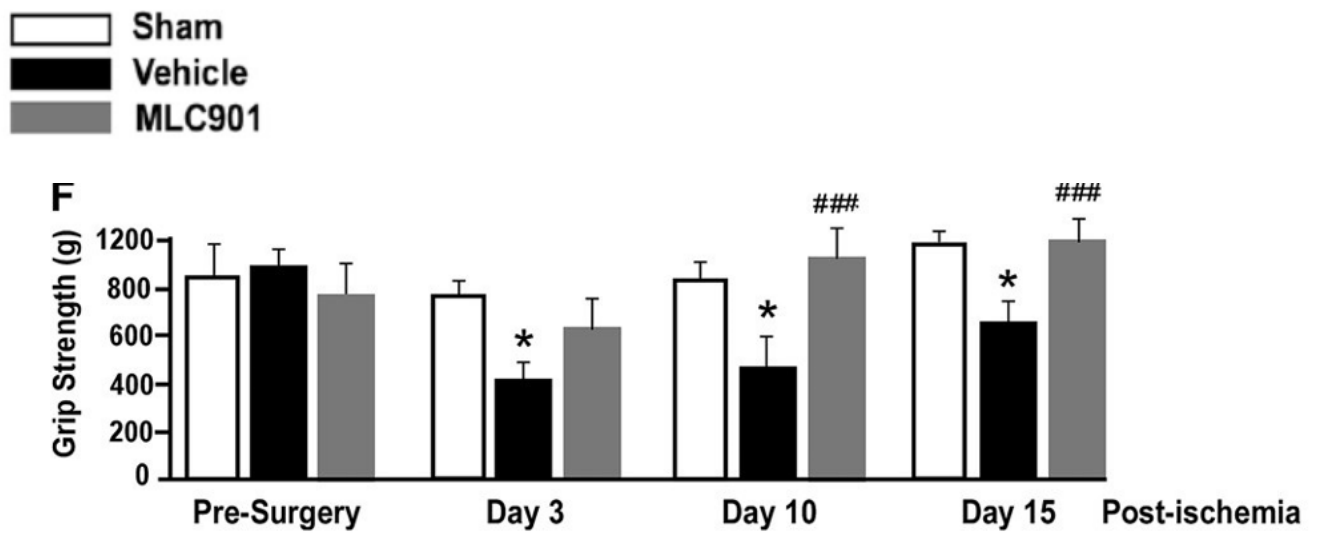


Figure 32: Histogrammes représentant la tension mesurée maximale au Grip Test à J-1, J3, J10, J15 post-ischémie (* $p < 0,05$ SHAM vs Vehicle, ### $p < 0,05$ Vehicle vs MLC901).

Piscine de Morris (Bioseb®)

Le test de la piscine de Morris (Figure 33) a comme objectif de tester les capacités d'apprentissage et de mémorisation spatiales des rats. Il consiste à apprendre au rat à localiser une plateforme située 1,5 cm sous le niveau de l'eau (rendue opaque) dans une piscine d'1,10m de diamètre. Des marqueurs spatiaux sont marqués au mur et visibles de toutes les zones de la piscine. L'analyse vidéo s'intéresse à la distance parcourue par l'animal, ainsi que la latence à laquelle la plateforme est retrouvée. La 1^{ère} phase, repose sur une période de 4 jours consécutifs avec 4 tests par jour, espacés de 2h, où l'animal apprend à situer la plateforme. S'il n'y arrive pas au bout de 60s, il est positionné sur la plateforme. Une fois sur celle-ci il y reste 30 sec, puis est séché, placé sous une lampe chauffante avant d'être remis dans sa cage d'origine. La seconde phase, ou test de remémoration, réalisée 72h après, consiste à retirer la plateforme et à mesurer au cours de 4 essais, espacés de 2h, d'une durée de 60 sec chacun, le temps passé au niveau de l'ancienne localisation de la plateforme. 6 animaux par groupe ont été étudiés. La reconnaissance spatiale et la mémoire épisodique sont médiées par le complexe hippocampique, alors que l'apprentissage est sous la dépendance de différentes aires (striatum, cortex préfrontal,...) (Hartley T, 2013).

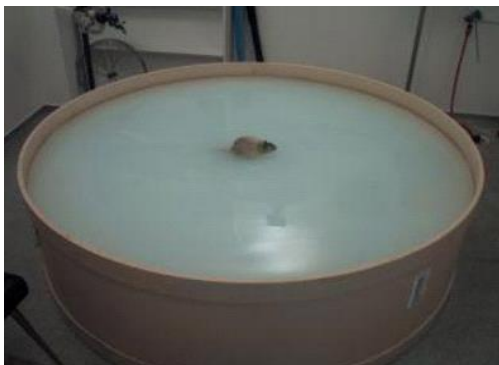


Fig 33: Piscine de Moris

Une semaine après l'ischémie, les rats Placebo, ont un délai de localisation de la plateforme, significativement plus long que les SHAM. Même si ce temps s'améliore avec la répétition des tests, la différence reste significative sur l'ensemble des épreuves (Figure 34 A). L'utilisation du MLC901 en post-ischémie, permet de restaurer ce délai au niveau des animaux SHAM testés (Figure 34 A). Ces résultats sont également confirmés 2 semaines après l'ischémie (Figure 34 B). On note que les animaux Placebo ischémiés ont une activité motrice significativement plus basse que les animaux témoins. Le MLC901 permet de restaurer cette activité à 1 et 2 semaines post-ischémie (Figure 34 A-C). De plus, le temps passé dans le quadrant contenant la plateforme est significativement plus court à 2 semaines dans le groupe Placebo que dans le groupe MLC901, qui devient équivalent à celui des SHAM (Figure 34 D). Les animaux traités au MLC901 dispensent beaucoup plus de temps dans le quadrant contenant la plateforme que les animaux Placebo (Figure 34 E).

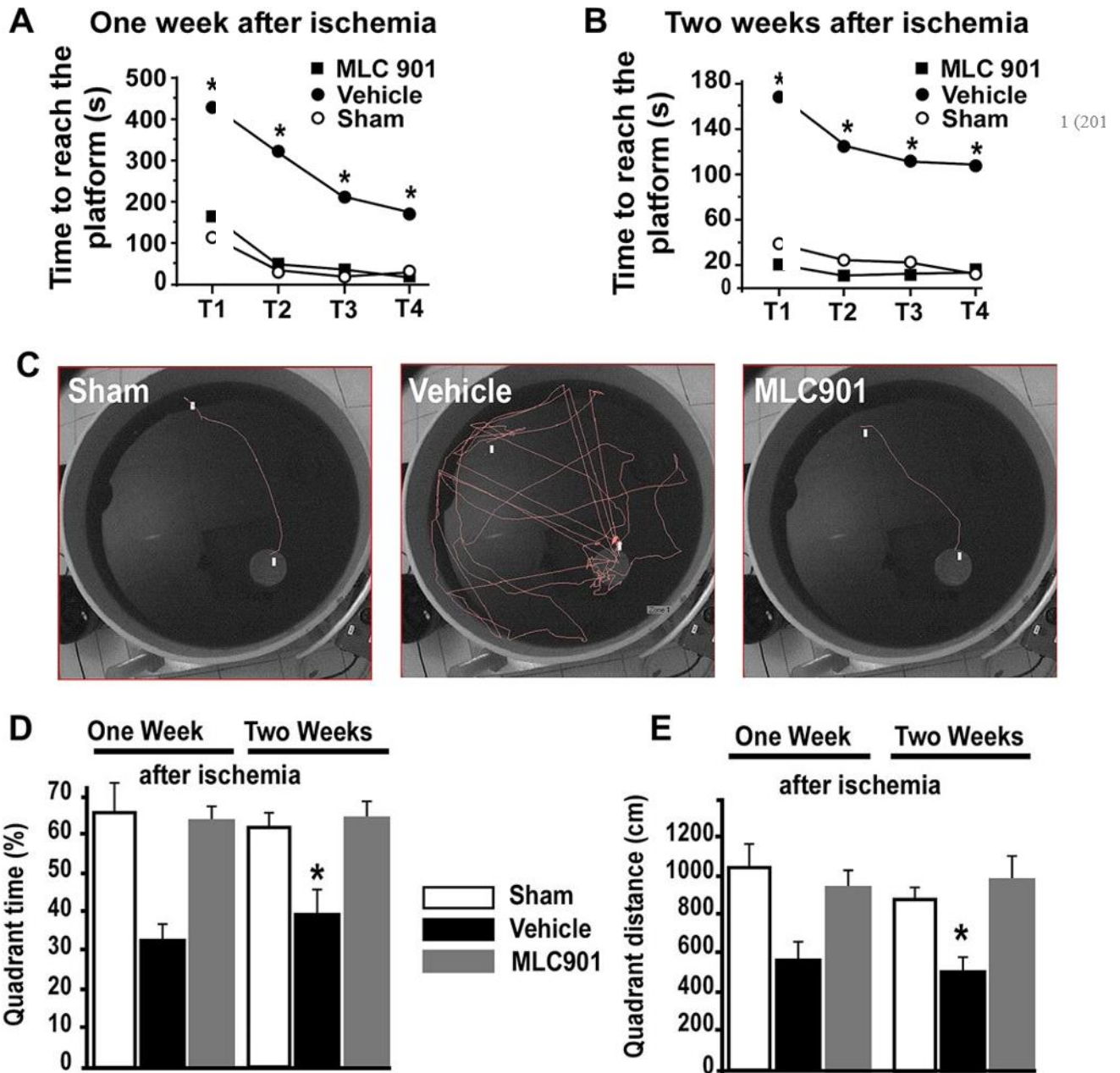


Fig. 34: le MLC901 diminue les déficits moteurs et cognitifs induits par l'ischémie globale. (A-B) Temps médian pour atteindre la plateforme dans le test de la piscine de Morris une (A) et 2 semaines post-ischémie (B). (* $p < 0.05$ versus sham et MLC901 groupes). (C) Exemples de trajet dans la piscine effectué par les membres de chaque groupe expérimental après 4 jours d'acquisition. (D-E) Pourcentage de temps (D) et distance de nage (E) moyens (SEM) dans le quadrant où était localisée la plateforme pendant le test une et deux semaines après la reperfusion) (* $p < 0.05$ versus sham et MLC901 groupes).

DISCUSSION

La recherche de nouvelles thérapeutiques dans le cadre de la prise en charge des maladies cérébrovasculaires est une nécessité au vue de l'importance des séquelles engendrées. Cette question est un réel problème de Santé Publique. Le développement de recherche dans le domaine de la souffrance ischémique cérébrale est donc essentiel. Des travaux récents sur l'ischémie focale ont montré que de nouvelles molécules aux effets pléiotropes pouvaient avoir un impact sur la neuroprotection post-AVC (Chen et al., 2009). Une étude préclinique chez la souris a montré qu'une formulation simplifiée du MLC601, appelé le MLC901, a démontré des effets neuroprotecteurs sur l'AVC (modèle MCAO). Les effets positifs du MLC901 sur l'étendue de la nécrose, l'apoptose ou encore la neurogénèse sont des aspects encourageants pour une étude translationnelle de ce composé vers la clinique dans le cadre de l'AVC. Dans le cas particulier de l'arrêt cardiaque, responsable d'une ischémie globale cérébrale, les moyens thérapeutiques à notre disposition sont faibles. En dehors d'une réanimation rapide, la neuroprotection induite par l'hypothermie a montré récemment son efficacité en recherche clinique (Bernard et al., 2002), mais représente un des rares traitements que nous pouvons proposer aux malades victimes d'ACR. L'objet de notre étude a donc été d'analyser, l'effet du MLC901, sur un modèle d'ischémie globale chez le rat, en terme de neuroprotection (nécrose, apoptose, stress oxydant), de neurorégénération, mais également en terme de récupération fonctionnelle des animaux. Les effets du produit semblent intéressants, au vue des résultats présentés précédemment.

La détermination de la dose optimale de traitement a été réalisée par une étude dose-effet, qui nous a permis de définir une dose à 0.074 mg/ml administrée 30 minutes après l'ischémie, puis en continu par voie entérale. La différence a été objectivée sur la protection engendrée au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe, structure la plus vulnérable à l'ischémie globale mais également en terme de survie des animaux.

Nous avons pu observer que ce produit peut avoir, en cas de surdosage, des effets toxiques à type de crise comitiale avec un taux de mortalité de 30 et 90% pour des concentrations respectives de 7.4 et 74 mg/mL. Au vue de l'action du MLC901 sur le canal K_{ATP} , il peut être envisagé que son effet hyperpolarisant est une étape cruciale dans l'effet neuroprotecteur du produit. Dans cette étude, nous montrons que la neuroprotection induite par le MLC901 touche les différentes voies de souffrance cellulaire, elle est pléiotrope. La nécrose est significativement moins importante dans le groupe traité à J7 post-ischémie. Le délai à 7 jours post-ischémie est classiquement choisi afin d'objectiver les lésions fixées de nécrose. Cette neuroprotection touche également l'apoptose, puisque par la méthode TUNEL nous confirmons la différence en termes de nombre de cellules apoptotiques entre les 2 groupes. Comme démontré précédemment l'apoptose est un mécanisme précoce de souffrance cellulaire, c'est pour cela que le délai de 3 jours post-ischémie a été choisi pour sacrifier les rats. On retrouve dans la littérature (Liang et al., 2008) des délais de sacrifice plus tardifs à J5. La comparaison des résultats par rapport à ces données pourrait expliquer la différence en termes de densité de cellules apoptotiques, qui est 3 fois moins importante dans notre étude par rapport à la littérature. Cette voie apoptotique semble être conduite par voie mitochondriale, car Bax semble être un acteur modulable par le traitement MLC901. En effet, Bax inducteur apoptotique de la famille Bcl-2 est significativement moins important dans le groupe MLC901 par rapport au groupe Placebo; cette voie de stimulation de l'apoptose semble donc être réprimée par le traitement testé. D'autres mécanismes de régulation de l'apoptose comme la voie PI3k/Akt ont également été testés. En effet PI3k, par la phosphorylation d'Akt (pAkt) au niveau du site serine-473 permet d'inactiver d'autres facteurs apoptogéniques tels que Bad ou la caspase-9 inhibant ainsi la mort neuronale. La voie Akt est aussi connue pour être impliquée dans la signalisation de la plasticité cérébrale, ce qui représente un candidat intéressant dans le cadre du MLC901. L'activation de pAkt induite par l'ischémie globale confirme les résultats

rapportés dans la littérature (Jover-Mengual et al., 2010). Le MLC901 a donc également une action anti apoptotique par l'intermédiaire de cette voie.

Ces mécanismes d'action divers sont essentiels pour obtenir une neuroprotection complète en post-ischémie comme nous l'avons souligné précédemment. L'action de MLC901 passe également par une neurogenèse tardive. Nous avons démontré dans cette étude, par l'intermédiaire d'un marquage immunohistochimique que dès J7 post-ischémie, la voie de "réparation" de la neurogénèse est activée avec apparition de cellules immatures au niveau de la zone neurogénique SGZ du dentate gyrus. Cette stimulation est amplifiée par un traitement. MLC901. Il a été démontré sur un modèle d'ischémie focale que la stimulation de cellules immatures sous l'effet du MLC901 conduit au développement d'un réseau neuronal dense, grâce à la maturation en neurones des cellules progénitrices, permettant ainsi de nouvelles connexions dans les zone lésées par l'ischémie (Heurteaux et al., 2010). La technique de double marquage permet également de préciser le phénotype de différenciation des cellules créées qui semble être essentiellement neuronal.

L'efficacité du produit sur la récupération fonctionnelle des animaux a été évaluée sur notre modèle confirmant les données cliniques publiées. En effet, on retrouve une amélioration des tests moteurs et cognitifs chez les animaux traités MLC901 par rapport aux animaux Placebo. Cet élément est essentiel pour pouvoir envisager un passage à des études cliniques à venir.

**EFFET DU MLC 901 SUR UN MODELE
TRAUMATISME CRANIEN INDUIT PAR
PERCUSSION LIQUIDIENNE LATERALE
CHEZ LE RAT**

INTRODUCTION ET OBJECTIF

A partir des données obtenues sur les travaux en ischémie focale et globale, nous avons voulu évaluer les effets neuroprotecteurs et neurorégénérateurs du MLC901 sur un modèle différent de souffrance cérébrale, le traumatisme crânien.

MATERIEL ET METHODES

A. *Les différents modèles de traumatisme crânien expérimentaux*

Le traumatisme crânien est, à la différence de l'AVC ou de l'ACR, un mécanisme plus difficile à approcher par des modèles expérimentaux du fait de l'extrême hétérogénéité des lésions induites.

Différents modèles de traumatisme crânien ont été développés dans la littérature (Xiong et al., 2013). Ceux-ci doivent répondre à certains critères de reproductibilité, et de capacité à pouvoir varier la sévérité de l'impact.

Modèles focaux (Figure 35)

Pour modéliser un traumatisme focal, différents moyens sont possibles : "weight drop closed injury", "fluid percussion impact", le "control cortical impact". Ces modèles sont associés lorsque l'impact est suffisamment important à des lésions axonales associées.

- *Weight drop model*

Ce modèle de percussion utilisant la gravité se réalise sans craniectomie préalable. Il reproduit un traumatisme crânien modéré. Cette technique risque cependant de créer des fractures osseuses lors d'impact de grande hauteur, mais également ne permet pas de se protéger de l'effet rebond du percuteur. Les lésions induites identifiées en histologie, sont représentées par une perte cellulaire corticale au niveau du site d'impact, ainsi que des lésions hippocampiques et corticales

bilatérales. Aucune étude n'a démontré un impact de ce modèle sur les tests comportementaux réalisés à distance (1 an).

- *Control Cortical Impact (CCI)*

Après réalisation d'une craniectomie, la dure mère est exposée à une colonne d'air pressurisée. L'impact induit sur le cerveau peut être modulé en temps, vitesse et profondeur. Il n'existe pas dans ce modèle d'effet rebond. Cet impact conduit au développement de lésions pétéchiales hémorragiques, accompagnés d'hématomes épидурaux et sous-duraux. La perte cellulaire est également retrouvée au niveau de l'hippocampe, du dentate gyrus et du thalamus homolatéral à la lésion.

- *Midline Fluid Percussion*

Décrite initialement chez le chat et le lapin, cette technique a été adaptée au rongeur. Après réalisation d'une craniectomie sous repérage stéréotaxique, la dure mère est exposée à l'impact d'une colonne liquidienne. L'intensité de cet impact peut être modulée par la hauteur de chute du pendule. Les lésions induites sont des lésions de matière grise associées à des pétéchies intraparenchymateuses, ainsi que des hémorragies intra-parenchymateuses. La diminution du débit sanguin cérébral persiste au delà de la première heure post-trauma au niveau de la zone d'impact. Cette diminution se résout dans les 4 heures.

- *The optic nerve stretch-injury model*

Ce modèle s'intéresse essentiellement aux lésions induites sur la substance blanche, en particulier les lésions axonales. Il consiste à mobiliser le nerf optique par une traction dans l'axe du globe oculaire.

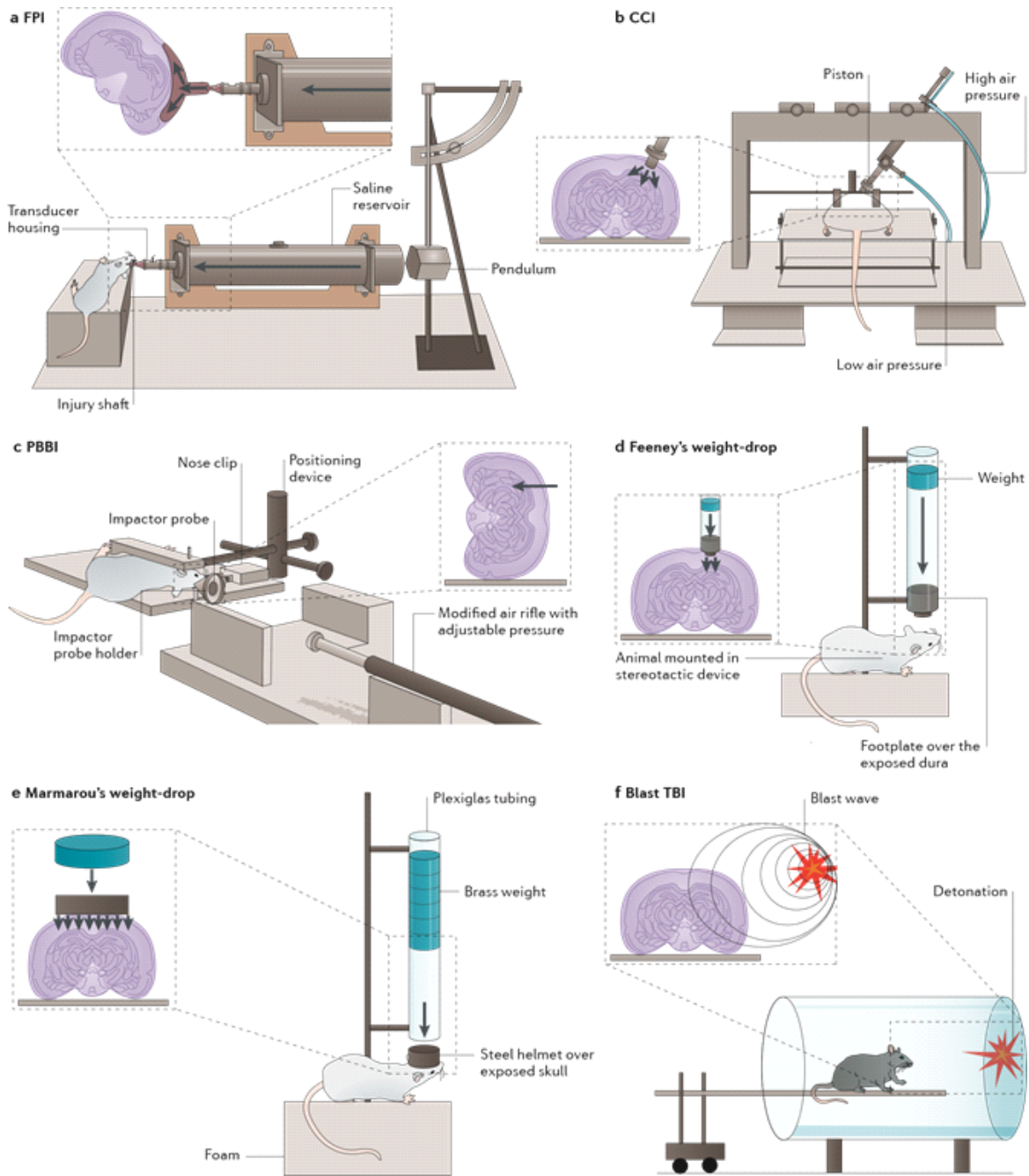


Fig: 35. Exemples de différents modèles de traumatismes expérimentaux

Modèles diffus

- *Impact acceleration model*

Afin d'éviter les fractures osseuses, décrites dans le "weight drop" modèle, une protection de la tête de l'animal peut être collée sur le vertex de l'animal avant l'impact. Ce modèle permet de faire varier l'intensité du trauma en faisant varier la hauteur et le poids de l'objet percuteur. Des lésions d'œdème, d'hémorragie sous-arachnoidienne, d'hématome cérébral et de pétéchies au niveau du cortex et de l'hippocampe ont été décrites. Lors de traumatismes graves, le déficit neurologique décrit peut aller jusqu'à un mois.

- *Diffuse injury model*

Un disque de métal est fixé sur le crâne de l'animal recevant l'impact d'une colonne d'air sous pression. On observe une diminution neuronale au niveau du CA3 de l'hippocampe, des lésions de la barrière hémato-encéphalique, un développement d'un œdème cérébral. Les déficits neurologiques persistent à la deuxième semaine.

- *Inertial acceleration brain injury model*

Ce modèle consiste à réaliser une rotation rapide (20ms) de 110° de la tête de l'animal. Il est essentiellement utilisé chez le cochon d'Inde, du fait de son anatomie encéphalique.

Les lésions rapportées concernent la substance blanche, ainsi que les zones de jonction substance grise - substance blanche. Peu d'études de comportement ont été réalisées actuellement, du fait de la faible disponibilité de ce test.

Modèles mixtes

- *Lateral Fluid Percussion*

La technique de percussion liquide médiane a été améliorée afin d'essayer d'obtenir une lésion de contre-coup. Ce modèle permet la réalisation d'un trauma focal et diffus, se rapprochant de la réalité des traumatismes crâniens chez l'homme. Les lésions induites décrites reposent sur des pertes cellulaires au niveau du thalamus, de l'hippocampe (Hicks et al., 1996). L'extension des lésions peut s'étendre jusqu'à un an post-trauma. Des dégénérescences cellulaires peuvent se voir sur des zones sensibles, telles que l'amygdale, le striatum, l'hippocampe et le thalamus. L'étendue des lésions est en rapport avec l'intensité du traumatisme, qui peut varier en fonction de la hauteur de chute du percuteur. En effet Helmich and al. , par une coloration Fluoro Jade au niveau de l'hippocampe ont démontré des lésions neuronales proportionnelles à l'intensité du traumatisme 1,2 atm (moyen), 2,0 atm (modéré) et 2,3 atm (sévère) (Helmich et al., 2005). La présence d'un oedème diffus et des lésions de la barrière hémato-encéphalique ont été rapportées. Suite au trauma, le débit sanguin cérébral augmente à 100% de sa valeur de base pour diminuer dans les 15 mn à 50% de sa valeur de base, et ceci pour une durée de 4h avec une perte du couplage débit métabolisme. Des altérations des tests cognitivo-comportementaux ont été rapportés jusqu'à un an post-trauma. Le modèle par percussion latérale peut être distingué en parasagittal (<3,5mm de la ligne médiane) ou latéral (>3,5mm), conduisant à des lésions différentes selon la localisation du traumatisme (Vink et al., 2001).

Modèles de lésions secondaires

En pratique clinique le traumatisme crânien est associé à des épisodes d'hypotension et de saignement, qui aggravent le pronostic. Des modèles expérimentaux ont essayé de reproduire ces conditions. Il semble que lorsque la durée des épisodes secondaires est prolongée, les lésions augmentent. L'hypoxie au-delà de 30 mn augmente les séquelles cognitives. Le délai de survenue de ces agressions secondaires n'entraîne

également pas les mêmes conséquences, les lésions sont plutôt sous- corticales précocément, et corticales secondairement.

Modèle de traumatisme crânien répétitif

Des modèles de traumatismes répétitifs ont été développés chez le rat et la souris par l'intermédiaire du CCI, du weight drop model ou du LFP utilisant des traumatismes de moyenne intensité. Il semblerait que le second choc réalisé entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour ait les conséquences les plus désastreuses sur les tests fonctionnels de water maze, et de rotarod. Les lésions retrouvées sont des lésions au niveau de la membrane hématoencéphalique et des lésions axonales retrouvées jusqu'à 4 semaines après le traumatisme. Ces travaux pourraient permettre d'expliquer les conséquences des traumatismes répétés présentés par les sportifs lors des sports à risque.

Le modèle que nous avons choisi dans notre étude est un modèle de percussion liquidienne latérale. Nous nous intéresserons donc dans la suite de notre travail uniquement à celui-ci, et à ses conséquences.

B. Modele de percussion fluide latérale (LFPI) : Technique (Figure 36)

Tous les rats sont installés et sont anesthésiés dans une boîte étanche reliée à un vaporisateur de gaz anesthésiant (l'Isoflurane). Le débit d'air délivré dans la boîte est de 0,5-1L/min et le débit d'isoflurane peut être réglé sur une échelle de 0% à 5% du débit d'air. La profondeur d'anesthésie est évaluée par la perte du réflexe de maintien vertical et par la stimulation douloureuse, tant par la pincée forte de la queue que par le positionnement dans le cadre de stéréotaxie. Il est nécessaire de surveiller l'état général du rat tout au long de l'expérience (respiration, battements cardiaques, température), afin d'ajuster les concentrations de gaz anesthésiant pour éviter la mort de l'animal. Il est en outre nécessaire d'être attentif aux mouvements des ses pattes qui sont signes

d'éveil. Le rat est ensuite retiré de la boîte et placé sur le cadre de stéréotaxie. La tête du rat est immobilisée entre les dents en avant et deux supports de maintien horizontaux placés dans les conduits auditifs externes ; un masque relié au vaporisateur est utilisé afin d'adapter le niveau d'anesthésie. On incise le crâne de l'animal longitudinalement en son milieu. A l'aide d'un coton tige, on récline muscles et périoste, afin d'accéder librement au vertex en regard du cortex pariétal gauche. A l'aide d'une fraise, on réalise un pré-trou de centrage de la tréphine à environ 4 mm de la ligne médiane, à mi-distance entre les sutures Bregma et le Lambda. Ce pré-trou permet de réaliser l'orifice de la craniectomie, qui met à jour la dure-mère qu'il faut absolument respecter. Un système d'adaptation à la machine de TC-PFL est ensuite collé de façon étanche, puis cimenté avec du ciment dentaire. L'étanchéité du système est vérifiée en injectant quelques gouttes d'eau à l'intérieur du puits. Après consolidation et durcissement de l'ensemble du système, l'anesthésie est arrêtée et juste avant l'éveil, le traumatisme est provoqué par l'impact d'un poids sur une colonne liquide (percussion fluide) mis en contact avec la dure-mère. Ce sont les micro-intrusions et extrusion transitoires (20 ms) de la colonne d'eau dans l'espace extra-dural, qui sont à l'origine des déplacements des structures cérébrales, et qui génèrent les lésions traumatiques observées. La machine permet d'analyser la contrainte mécanique et fournit un tracé électrique par un transducteur, qui permet de déduire l'intensité du choc délivré. A partir des données de calibration, un choc d'une intensité de 2,2-2,4 atmosphères est délivré sur une durée de 20 ms, permettant de définir un choc d'intensité sévère. Après le trauma, on suture l'incision, et on place à nouveau le rat dans une cage après s'être assuré de la récupération des fonctions vitales et du confort du rat. Les rats nommés SHAM sont des rats ayant subi une préparation chirurgicale sans traumatisme crânien. Ils remplissent le rôle de témoin lors de nos expériences.

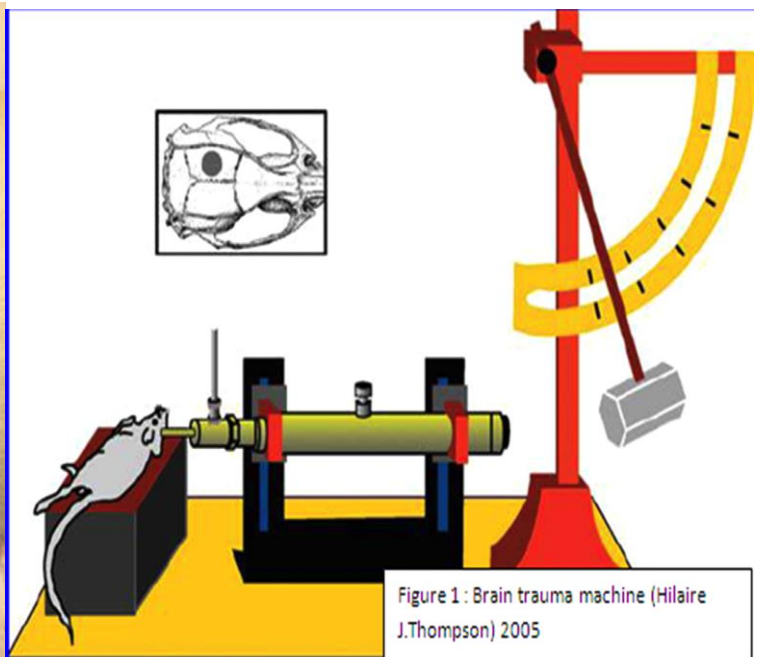


Fig 36: Traumatisme cranien par percussion liquidienne latérale

Animaux

Les animaux utilisés sont des rats males Spragues Dawley 300g (Laboratoires Janvier). Notre étude a reçu l'accord du comité d'éthique.

Toutes les techniques ont été mises en œuvre pour contrôler la douleur et le stress des animaux et pour réduire le nombre d'animaux nécessaires. Immédiatement après leur arrivée au laboratoire, les rats sont placés par deux dans des cages standardisées (42x29x15 cm) et hébergés dans une animalerie maintenue dans des conditions de température ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) et d'humidité constantes ($55 \pm 10\%$). Le cycle d'éclairage est inversé (12h de nuit, 12 h de jour). Les animaux ont un libre accès à l'eau et à la nourriture.

Design de l'étude

L'étude a été réalisée sur des rats répartis en trois groupes. SHAM, traumatisme cérébral Placebo et un traumatisme cérébral MLC901. Le MLC901 a été dilué dans une solution saline (comme véhicule) à la concentration de 0,074 mg / ml (solution stock) et incubé sous agitation pendant 1 h à 37°C (concentration définie dans protocole antérieur). La solution est ensuite filtrée à 0,22 mm filtre. Les rats ont été injectés (1mL) en intrapéritonéal avec une dose unique de MLC901 1 h après le traumatisme (cf infra) suivie par une alimentation entérale en boisson jusqu'à sacrifice de l'animal (6mg/mL). La dose intraveineuse MLC901 utilisée a été sélectionné sur la base des concentrations utilisées chez l'homme (Chen et al., 2009) et rapporté chez le rat, en fonction du rapport poids/surface de l'animal (Reagan-Shaw et al., 2008).

Le flowchart des différentes expérimentations est rapporté en Annexe.

RESULTATS

- *Evaluation de la fenêtre thérapeutique :*

La première étape de notre travail a été de définir le meilleur "timing" d'administration du produit. Pour cela, nous avons testé différents temps d'injection du MLC901 sur des rats à H1, H2 et H3 post-traumatisme crânien. Les animaux recevaient ensuite le produit pendant une semaine par voie entérale, puis étaient sacrifiés à J7. Afin de définir l'importance de la lésion, nous avons choisi de quantifier le nombre de cellules marquées présentes dans la zone sous lésionnelle à J7 du traumatisme. La coloration des différentes lames se fait par immersion successive dans une solution de Crésyl violet, permettant ainsi de mettre en évidence les cellules non lésées par nécrose.

Nous avons inclus 6 rats par groupe et mesuré la densité cellulaire/mm² en zone sous corticale de l'hémisphère traumatisé à J7. On observe un effet significatif du produit entre la 1^{ère} et la deuxième heure (Figure 37). Nous choisirons donc un délai d'injection compris entre la 1^{ère} et la 2^{ème} heure du traumatisme pour la suite de notre étude.

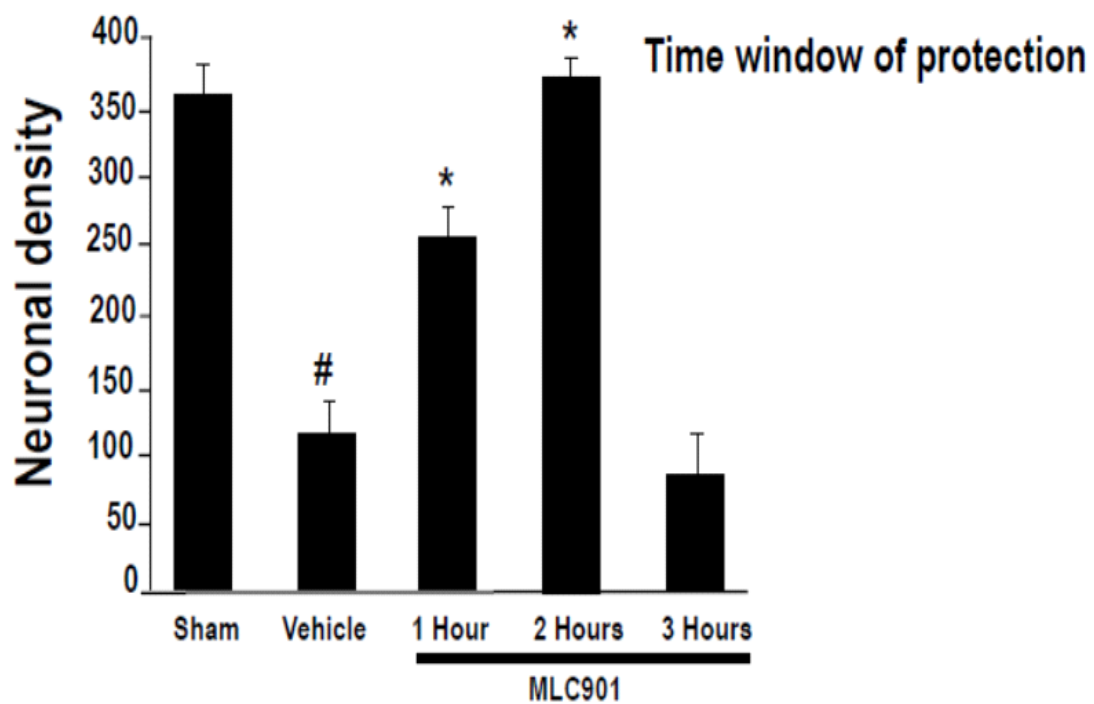


Fig 37: Densité cellulaire moyenne (SEM) par mm² post-traumatique en zone sous lésionnelle (fenêtre thérapeutique) (* $p < 0,01$ vs Vehicle ; # $p < 0,01$ vs SHAM)

- *Lésions post-TC : Effets du MLC901*

Dixon a étudié dans un travail réalisé en 1987, les effets d'une percussion à plusieurs intensités sur le devenir fonctionnel de rats (Dixon et al., 1987). Une de ses premières observations a été de remarquer que l'évolution des lésions cérébrales est corrélée à l'intensité de la percussion (Tableau 6). En effet dans le groupe des animaux percutés à 3,8 Atm, 100% des animaux mourraient. Il observait par contre un taux de mortalité faible (10%) pour des chocs réalisés à 2,1 Atm. Dans ces cas précis l'ensemble des animaux mourraient d'oedème pulmonaire. Qian et al. , retrouvent une mortalité plus basse sur une étude s'intéressant à l'effet d'une LFP d'intensité croissante chez le rat (Qian et al., 1996b). En effet, la mortalité était de 100% pour des rats étant soumis à une impulsion de 4,33 Atm (G3), de 31% pour ceux soumis à 2,7-3,87 Atm(G2b), et de 6% pour ceux soumis à 1,53-2,33 Atm(G2a). Dans cette même étude, il décrit l'importance des lésions histologiques induites en post-traumatisme. Il observe de suite après le traumatisme une hémorragie sous- arachnoidienne avec des pétéchies prédominant au niveau fronto pariétal, du corps calleux, du 3^{ème} ventricule et du cervelet. Ces lésions évoluent dans le temps, avec apparition de nécrose et cavitation au niveau de ces mêmes zones dans les jours suivant le traumatisme. Il observe également des lésions hippocampiques touchant le CA1 mais également le CA2 et CA3, apparaissant pour des intensités de trauma de 1,53 Atm (Figure 38).

Acute pathological responses following fluid percussion injury in the rat*

Injury (atm)	No. of Rats	% Mortality	Pulmonary Edema Incidence (%)		Convulsive Episodes Incidence (%)		Transient Apnea			
							Nonsurvivors		Survivors	
			Nonsurvivors	Survivors	Nonsurvivors	Survivors	Incidence (%)	Mean Duration (sec)	Incidence (%)	Mean Duration (sec)
2.1	10	10	100	0	0	0	0	-	10	30
2.9	9	22	50	0	50	11	50	60	29	42
3.4	15	40	83	0	33	13	60	55	20	35
3.6	13	38	60	0	80	15	20	31	37	61
3.8	6	100	17	-	67	-	25	40	-	-

* - = not applicable.

Tableau 3: Mortalité et LFPI (Dixon et al., 1988)

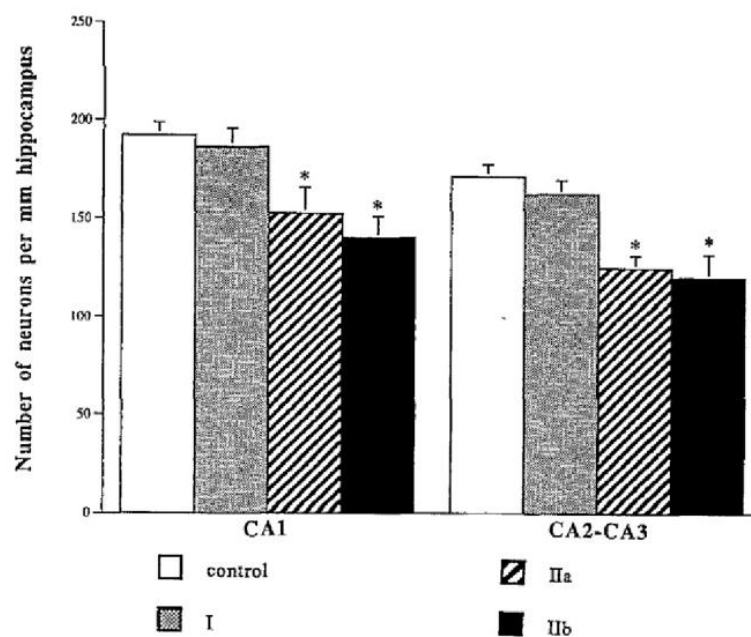


Fig. 6. Reduction in the number of neuronal cells in areas CA1 and CA2-CA3, compared with controls. The number of neuronal cells was significantly decreased in Group II a and b ($p < 0.05$)

Fig 38: Lésions de l'hippocampe CA1 et CA2-CA3 en fonction de l'intensité croissante de trauma (I<1,53 Atm, Iia : 1,53-2,73 Atm, Iib : 2,7-3,87Atm) (* $p < 0,05$ vs control)(Qian et al.,1996b)

Etendue lésionnelle : Histologie

Afin de savoir si le MLC901 avait une action neuroprotectrice, nous nous sommes intéressés à l'étendue des lésions cérébrales par ***planimétrie histologique*** réalisée sur 10 rats selon la méthode suivante : les cerveaux des rats traumatisés MLC901 et Placebo sont récupérés à H24 post-LFPI réalisé avec une intensité de 2,4 Atm. Ils sont immédiatement coupés et mis sur lame. Les lames sont ensuite plongées dans une solution de Triphenyltetrazolium chlorure 2% (TTC) et laissés incubés 20mn dans le noir. On les fixe par la suite avec du paraformaldéhyde 4% pendant 12h. Le TTC, redox indicateur, permet d'étudier les tissus métaboliquement actifs colorés en rouge des tissus métaboliquement inactifs incolore. La planimétrie lésionnelle a été réalisée grâce au logiciel Olympus®.

A cette intensité de trauma, aucun des rats n'est mort au décours de l'expérience. La *surface lésionnelle maximale* au niveau de la zone d'impact des animaux traités par MLC901 est significativement moins étendue que celle des animaux Placebo ($23 \pm 10 \text{ mm}^2$ vs $6 \pm 2 \text{ mm}^2$ $p < 0,05$; $n=6$ par groupes) (Figure 39).

La quantification du ***volume lésionnel histologique*** s'est faite par planimétrie lésionnelle (logiciel Olympus®) sur coupes histologiques colorées par Crésyl violet (cf supra. Le volume lésionnel a été calculé en utilisant l'estimation de Cavalieri reposant sur l'équation suivante :

$$V = t \times a(s) \times \sum S (\text{lésion})$$

t = épaisseur de la coupe

$a(s)$ = surface lésionnelle

$\sum S (\text{lésion})$ = somme des coupes comportant la lésion

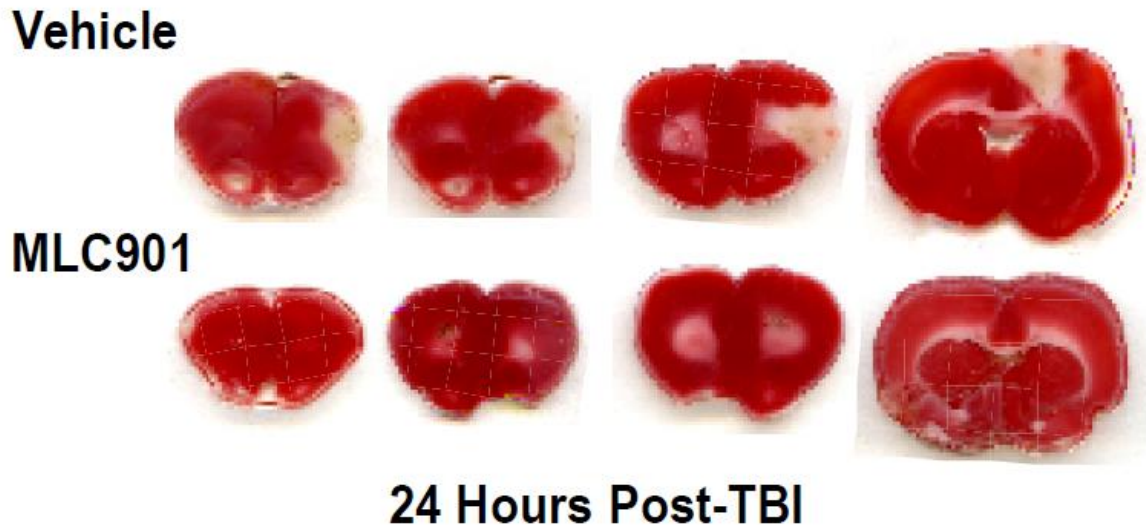


Figure 39 : Marquage TTC sur le groupe Placebo et MLC901

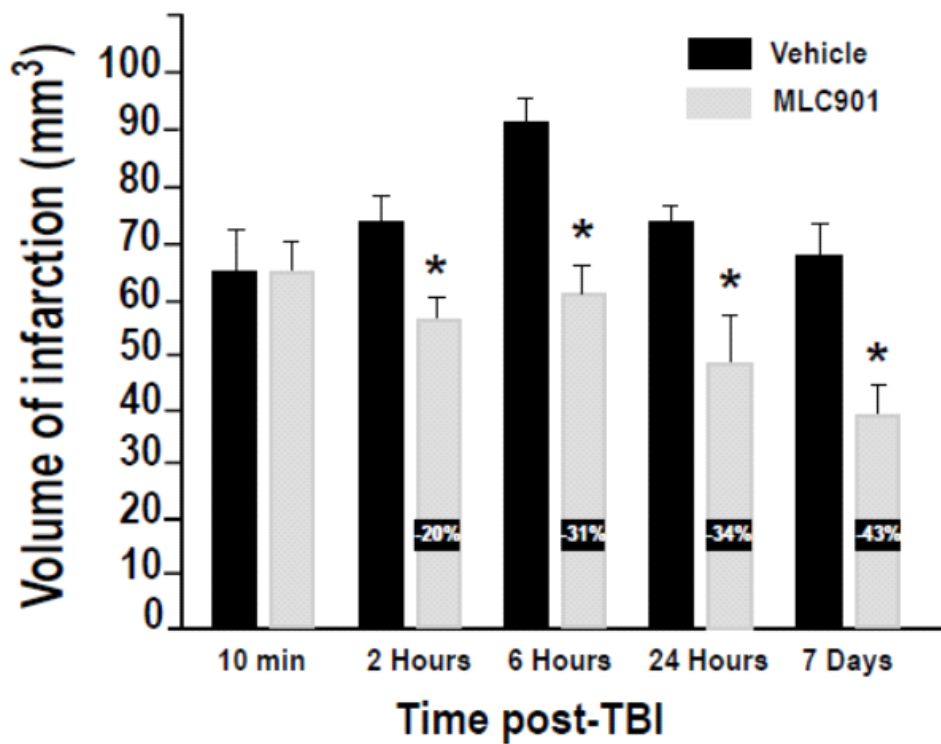


Figure 40: Volume moyen (SEM) lésionnel en fonction du temps post-TC (* $p < 0,01$ vs Vehicle)

L'évaluation s'est faite à différents temps 10mn, H2, H6, H24 après le traumatisme afin de suivre l'évolution des lésions. L'effectif a été de 2 rats par groupe et par temps.

Le volume lésionnel le plus important est mesuré à H6 pour le groupe Placebo. On observe une diminution significative par rapport au Placebo du volume lésionnel, quelque soit le temps chez les animaux traités par MLC901 (Figure 40). La diminution de volume entre les 2 groupes varie entre 20 et 43% selon le temps.

Afin de localiser plus précisément les *zones anatomiques atteintes* suite au TC, nous avons réalisé un marquage par acide fuchsine.

Trois groupes de 10 rats sont étudiés : SHAM, Placebo, MLC901. Après le traumatisme, les rats sont sacrifiés à 0mn, 10mn, 2h, 6h, et 24h. Des coupes de 8µm réalisées en paraffine tous les 250µm sont réalisées. Les coupes sont ensuite traitées avec de l'acide fuchsine (1mg/ml) permettant d'identifier les neurones lésés et la localisation des lésions. Le comptage lésionnel se fait sous microscope optique.

On observe des lésions neuronales touchant le CA3 et le thalamus et le dentate gyrus (DG) homo- et contra-latéral dès 10mn post- trauma. Le pic lésionnel se situe entre la 2^{ème} et la 6^{ème} heure post- traumatique. Le nombre de cellules lésées est significativement plus important dans le groupe Placebo que dans le groupe MLC901 aux temps H2 et H6 au niveau du CA3, du thalamus et du DG homolatéral à la lésion ($p < 0,05$) (Figure 41).

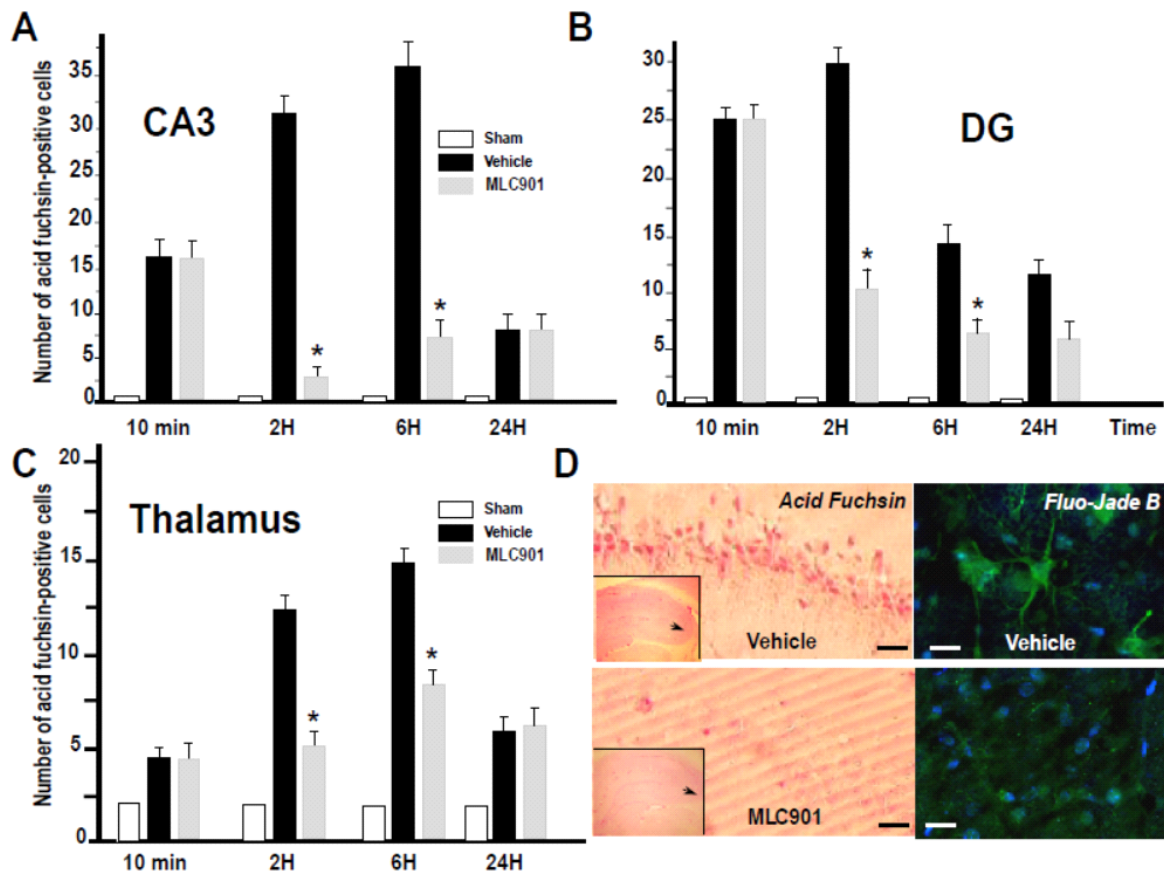


Figure 41: Marquage par l'acide fuchsin des neurones au niveau du CA3(A), Dentate gyrus (DG)(B) et Thalamus(C) en fonction du temps post-TC groupe Placebo et groupe MLC901 (moyenne (SEM)* $p < 0,05$ vs Vehicle)

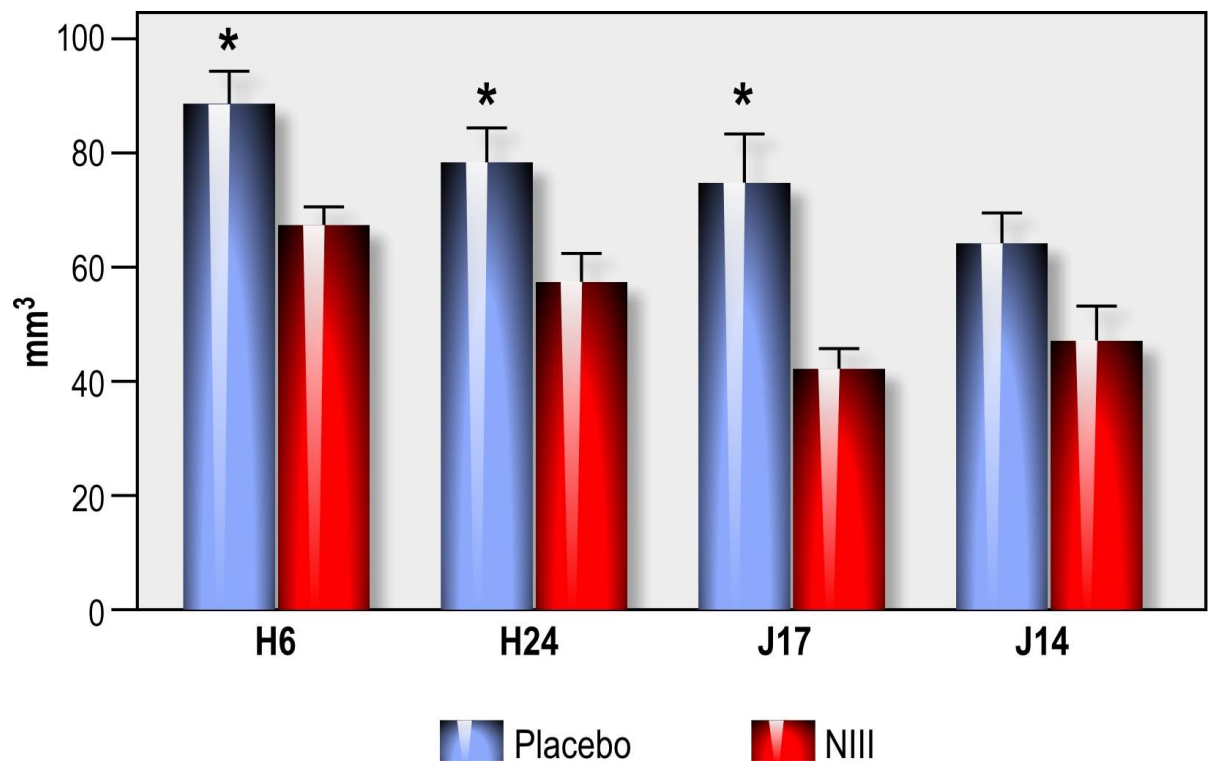
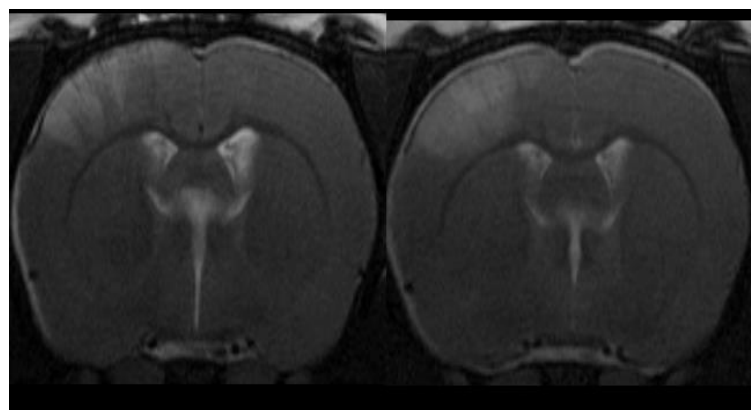


Figure 42 : Volume lésionnel IRM mesuré en T2 dans le groupe Placebo et MLC901 (* $p < 0,05$ vs Placebo)



Etendue lésionnelle : IRM

D'autres techniques peuvent être utilisées pour évaluer l'importance lésionnelle suite au TC. Qian et al. ont utilisé l'IRM comme moyen d'évaluation des lésions induites par le trauma. Ils décrivent dès H4 un hypersignal en séquence T2 au niveau du cortex homolatéral et du corps calleux, avec une majoration de la taille de cette lésion entre H6 et H24, puis diminution progressive avec disparition de l'hypersignal à J14 (Qian et al., 1996a). Cette étude a corrélé ces lésions avec une étude histologique qui retrouve une picnose cellulaire sur le cortex et le corps calleux se développant entre H6 et H24. Celle-ci est également présente au niveau de l'hippocampe à H24, puis diminue progressivement sur 14 jours. Afin de confirmer ces données et les comparer aux données histologiques, nous avons utilisé ***l'imagerie par résonance magnétique (IRM)***, grâce à une collaboration réalisée avec l'équipe TIGER (Inserm Lyon) et le CERMEP (Lyon). Sous anesthésie générale (Isoflurane), et sous monitoring du rythme respiratoire (rythme maintenu entre 62 et 68 cycles /mn permettant d'ajuster l'isoflurane entre 0,7 et 1,7%. Les animaux étaient positionnés dans une IRM de 4,7 T en interface avec la console Varian Inova. L'imagerie a été réalisée à 6h, 24h, 7 j et 14j après le traumatisme. L'imagerie anatomique en T2 était obtenue en utilisant une séquence spin echo, où le temps d'écho était de 70 msec, le temps de répétition de 2,500 millisecondes et le champs de 4x4cm². On obtient ainsi 15 coupes cérébrales (épaisseurs de 1mm). Le centrage des coupes s'est fait à 3,6mm de la bregma. La durée d'examen est en moyenne de 10,5 mn. L'évaluation IRM se fait à plusieurs temps 6h, 24h, J7 et J14. L'estimation du volume s'est faite, comme précédemment par l'évaluation de Cavalieri. Le volume lésionnel sous-cortical maximal est évalué à H6 pour le groupe Placebo et le groupe MLC901 (93,25 vs 65,8mm³ p<0 ,05). On observe une diminution du volume lésionnel avec le temps dans les 2 groupes. On observe une différence de volume significative entre les 2 groupes à H6, H24 et J7 (Figure 41). En comparaison avec les données histologiques, on remarque une sous-estimation globale de 30% de

l'histologie par rapport à l'IRM concernant l'évaluation du volume lésionnel sous-cortical.

Effet du MLC901 sur les biomarqueurs S100B et NSE

Nous disposons de marqueurs biologiques actuellement dosables en pratique clinique quotidienne, qui nous permettent d'apprécier le pronostic des patients victimes d'un TC (Mercier et al.). Nous nous sommes donc intéressés à ceux-ci dans ce contexte.

La protéine S 100

La protéine dimérique S100 est quasi exclusivement sécrétée par les astrocytes et les cellules de la gaine de Schwann (Santamaria-Kisiel et al., 2006). Elle est aussi synthétisée par les adipocytes, les cellules dendritiques de la peau et les mélanocytes, dans des concentrations 30 à 100 fois moindres que dans le tissu glial. Au niveau intracellulaire, sa capacité de fixation du calcium en fait un élément de régulation de l'architecture cellulaire en interaction avec des protéines du cytosquelette (protéine, tubuline, GFAP). Au niveau extracellulaire, elle exerce une action sur la croissance des neurones et leur apoptose (Donato, 2003). La demi-vie de la S100 est de 60 à 90 minutes. Son élimination est rénale. La concentration relevée dans le LCR, environ dix fois supérieure à la concentration plasmatique, rend probablement compte d'un processus intermédiaire d'élimination. L'élévation des taux de la S100 dans le sérum ou le LCR peut résulter de 2 mécanismes distincts : une surexpression génique d'origine cérébrale (maladie d'Alzheimer, trisomie 21), tumorale (glioblastome, mélanome malin) ou une libération accrue consécutive à une lyse cellulaire cérébrale (maladie de Creutzfeld-Jakob, sclérose en plaque, traumatisme crânien, AVC ischémique ou hémorragique, hémorragie sous-arachnoïdienne). De nombreuses études ont exploré l'intérêt pronostique de la S100 au cours du traumatisme crânien (Pleines et al., 2001; Uden et al., 2007; Vos et al., 2004). Par ailleurs son dosage

permettrait de sélectionner parmi les victimes de traumatismes crâniens modérés celles devant bénéficier d'un scanner cérébral ou d'une surveillance intensive (Biberthaler et al., 2006). Au cours de l'accident vasculaire cérébral ischémique, on observe une élévation significative du taux de S100, en corrélation avec l'étendue de l'infarctus et le pronostic neurologique (Nash et al., 2008).

La Neuro Specific Enolase

L'énolase est une des 13 enzymes intervenant dans la glycolyse anaérobie. Les différentes sous-unités qui la composent permettent d'en distinguer plusieurs isoformes. La sous-unité est présente essentiellement dans les cellules musculaires striées. Les sous-unités sont retrouvées dans le tissu nerveux, les cellules gliales exprimant une forme et les neurones produisant spécifiquement la sous-unité. On appelle ainsi Neuron Specific Enolase ou NSE l'isoforme constituée d'au moins une sous-unité dont on réalise le dosage en routine. La demi-vie de la NSE est de 4 à 14 jours. L'utilisation de la NSE en pratique clinique se rencontre dans deux cadres nosologiques : le diagnostic, le pronostic et le suivi du traitement des tumeurs neuro-endocrines (neuroblastome, carcinome médullaire de la thyroïde, cancer broncho-pulmonaire à petites cellules...) et dans les pathologies neurologiques aiguës. Les études mettent en avant l'intérêt pronostique de la NSE au cours des encéphalopathies post-anoxiques après ACR (Pfeifer et al., 2005). Des taux élevés de NSE sont corrélés à l'intensité de la réponse inflammatoire au cours du traumatisme crânien grave (Pleines et al., 2001). Enfin, le taux de NSE semble s'élever en cas d'AVC ischémique, en rapport avec le volume de tissu infarci sans être corrélé au pronostic neurologique (Anand and Stead, 2005).

Bien qu'après traumatisme ces 2 enzymes n'ont jamais été corrélées à l'étendue des lésions, nous nous sommes intéressés à suivre leurs cinétiques respectives, chez les

animaux traités par MLC901 et par Placebo (n=6 rats par groupe), en collaboration avec le *laboratoire d'hormonologie, hôpital Saint-Roch, du CHU de Nice*.

Après trauma, les animaux sont sacrifiés et prélevés par ponction intracardiaque 10mn, 2h, 6h et 24h après le traumatisme. Le prélèvement était fait sur tube "Vacuette" Z serum Sep clot activator. Dès l'arrivée au laboratoire, le tube est centrifugé et les dosages réalisés immédiatement :

-pour le dosage de S100 : le Liaison S100 (DiaSorin S.p.A, Sallugia, Italie) est un immunodosage automatisé chimiluminométrique quantitatif de type sandwich, utilisant des anticorps monoclonaux, pour la détermination de la protéine S100 dans le sérum et le LCR.

La prise d'essai est de 100 µL, la gamme de mesure est de 0,02 à 30 µg/L. Le Coefficient de variation intra-essai est de 3,1 % et inter-essai 8,2 % pour une valeur de 0,3 µg/L, et de 2,8 % et 3,7 % pour une valeur à 1,6 µg/L. La limite de détection est de 0,02 µg/L.

-Pour le dosage de NSE : le Liaison NSE (DiaSorin S.p.A, Sallugia, Italie) est un immunodosage automatisé chimiluminométrique quantitatif de type sandwich, pour la détermination de l'enolase neuro-spécifique dans le sérum et le LCR. La prise d'essai est de 25 µL, le Liaison NSE permet de mesurer des concentrations jusqu'à 200 µg/L. Le Coefficient de variation intra-essai est de 0,9 % et inter-essai 5,3 % pour une valeur de 17,9 µg/L, et de 2,3 % et 4,5 % pour une valeur à 37,3 µg/L. La limite de détection est de 0,04 µg/L.

On observe 2 heures après le traumatisme, chez les rats Placebo, un pic de S100 B significativement plus élevé que dans le groupe traité MLC901 et le groupe SHAM (respectivement $1,085 \pm 0,9$; $0,295 \pm 0,19$; $0,16 \pm 0,06$ ($p < 0,05$). Cette différence disparaît à H6 (Figure 43).

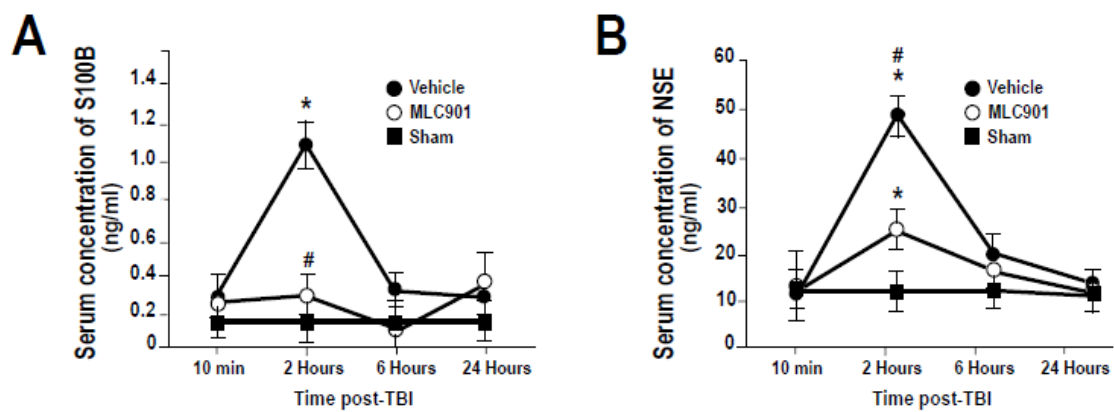


Fig. 43: Dosage sanguin de S100B et NSE à différents temps post-trauma (groupe Placebo (Vehicle), MLC901 et SHAM (moyenne (SEM)* $p < 0,05$ vs SHAM, # vs Vehicle)

Effet du MLC901 sur l'œdème cérébral

Comme nous l'avons décrit précédemment l'œdème cérébral est un mécanisme complexe qui tient une part importante dans la prise en charge des traumatisés crâniens. Nous nous sommes intéressés à ce mécanisme dans notre modèle de LFPI, afin de savoir si le MLC901 pouvait avoir un impact sur son développement.

Pour cela, la mesure de l'œdème cérébral a été réalisée par mesure du contenu en eau cérébrale. Les animaux ont été sacrifiés à J1 après le traumatisme (n=6 par groupe). Après euthanasie, les cerveaux étaient récupérés, scindés en 2 hémisphères, seul l'hémisphère traumatisé était conservé. L'hémi-cerveau était pesé, permettant de déterminer son poids dit "humide". L'hémi-cerveau était ensuite déshydraté pendant 24h à 95°C, puis pesé afin de déterminer son poids dit "sec". Le contenu en eau de l'hémi-cerveau (% WBC) est défini selon la formule :

$$\% \text{ WBC} = ((\text{Poids humide} - \text{Poids sec}) / \text{Poids humide}) * 100.$$

A J1 post-trauma, on observe une augmentation significative du contenu en eau cérébral dans l'hémisphère traumatisé par rapport à un animal témoin non traumatisé ($77\% \pm 0,9$ vs $71\% \pm 1,7$, $p < 0,05$). Le MLC901 limite significativement cet œdème à J1 post-trauma (Figure 43).

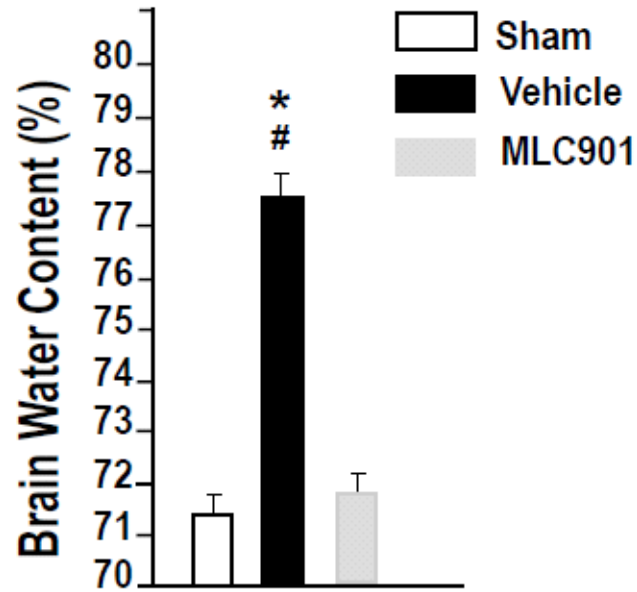
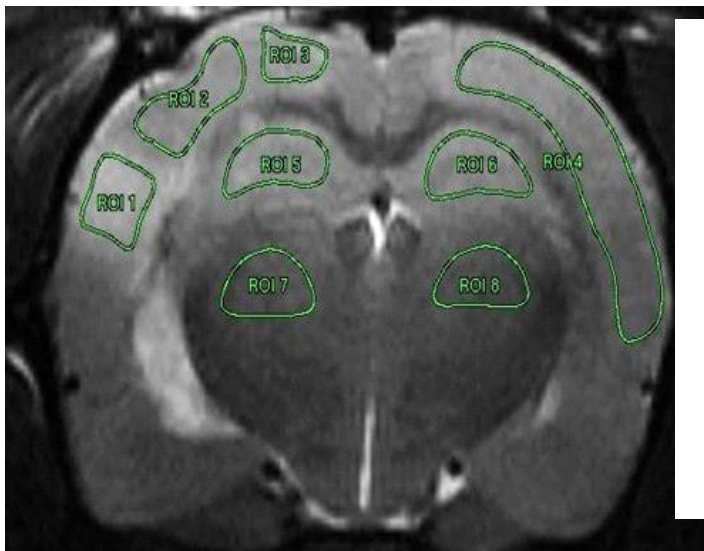


Fig 44: Contenu en eau de l'hémisphère lésé 24 h après le trauma dans le groupe Placebo, Vehicle et MLC901 (* $p < 0,05$ vs SHAM ; # $p < 0,05$ vs Vehicle)



- ROI 1 Zone lésionnelle
- ROI2-ROI3 Zone péri lésionnelle
- ROI 4 Zone corticale controlatérale
- ROI 5 Hippocampe homolatéral
- ROI 6 Hippocampe controlatéral
- ROI 7 Thalamus homolatéral
- ROI 8 Thalamus controlatéral

Fig 45: Visualisation des zones cérébrales d'intérêt (ROI) en IRM

Afin d'étudier l'effet antioedémateux induit par le MLC901, nous avons utilisé l'imagerie par résonance magnétique, grâce à une collaboration réalisée avec l'équipe TIGER (Inserm Lyon) et le CERMEP (Lyon). L'imagerie pondérée en diffusion (DWI), et particulièrement l'étude du coefficient de diffusion apparent (ADC) apporte des informations concernant la structure et la physiopathologie des lésions. Cette séquence permet de faire la part entre l'origine vasogénique ou cytotoxique de l'œdème (Barzo et al., 1997).

Sous anesthésie générale (Isoflurane), et sous monitoring du rythme respiratoire (rythme maintenu entre 62 et 68 cycles /mn permettant d'ajuster l'isoflurane entre 0,7 et 1,7%. les animaux étaient positionnés dans une IRM de 4,7 T en interface avec la console Varian Inova. L'imagerie a été réalisée à 6h, 24h, 7 j et 14j après le traumatisme. L'imagerie anatomique en T2 était obtenue en utilisant une séquence spin echo, ou le temps d'écho était de 70 msec, le temps de répétition de 2,500 millisecondes et les champs de 4x4 cm². On obtient ainsi 15 coupes cérébrales (épaisseurs de 1mm). Le centrage des coupes s'est fait à 3,6mm de la bregma. La durée d'examen est en moyenne de 10,5 mn. Les régions d'intérêt (ROIs) sont définies sur une image anatomique obtenue au cours du même examen. Les ROIs sont définies comme suit (Figure 45).

L'ADC est défini en fonction de la carte de diffusion. Il est défini comme le rapport :

$$\text{Ln} (S1/S2)/(B2-B1)$$

S1 : signal émis post gradient G1

S2 : signal émis post gradient G2

B1 : facteur d'atténuation du gradient G1

B2 : facteur d'atténuation du gradient G2

Un ADC diminué en pathologie correspond à la présence d'un œdème cytotoxique, alors qu'un ADC augmenté est plus en faveur d'un œdème de type vasogénique.

Au niveau de la ROI 1, à H6, on observe une diminution significative du coefficient dans le groupe Trauma+Placebo par rapport au groupe SHAM ($6,7 \cdot 10^{-4}$ vs $7,4 \cdot 10^{-4}$; $p < 0,05$). Le groupe Trauma+MLC901 n'est pas significativement différent du groupe SHAM à H6. Dans le groupe Trauma+Placebo, il existe une augmentation de l'ADC au cours du temps significative à J14 ($9,7 \cdot 10^{-4}$ vs $6,7 \cdot 10^{-4}$, $p < 0,05$). L'ADC augmente significativement dans le groupe Trauma+ MLC901 à J7 et J14, par rapport à H6 ($6,8 \cdot 10^{-4}$ vs $7,8 \cdot 10^{-4}$ et $9 \cdot 10^{-4}$; $p < 0,05$). Nous n'observons pas de variation de l'ADC sur les ROI 2 à 8 en fonction du temps (Figure 46).

Comme nous l'avons décrit précédemment les *aquaporines* jouent un rôle important dans l'évolution de l'œdème cérébral. Nous nous sommes donc intéressés à ces canaux. Les techniques de Western blot et d'immunomarquage ont été réalisées selon les techniques déjà décrites dans le modèle d'ischémie globale. En utilisant la technique du Western Blot, on observe à H2 dans la zone corticale, une diminution de l'expression d'AQP4 dans le groupe trauma Placebo de 20%. Cette diminution est plus importante dans le groupe MLC901 avec une diminution proche de 40%. Par contre, sept jours après le traumatisme, on observe dans le groupe MLC901, une augmentation de l'expression d'AQP4, proche de 60%, alors qu'il n'y a pas de variation dans le groupe Placebo (Figure 47). On confirme en immuno marquage les résultats du Western blot. De façon intéressante, on observe une augmentation du marquage en AQP 4, dans le groupe MLC901, au niveau de la périphérie des vaisseaux sanguins à J7 post traumatique (Figure 47).

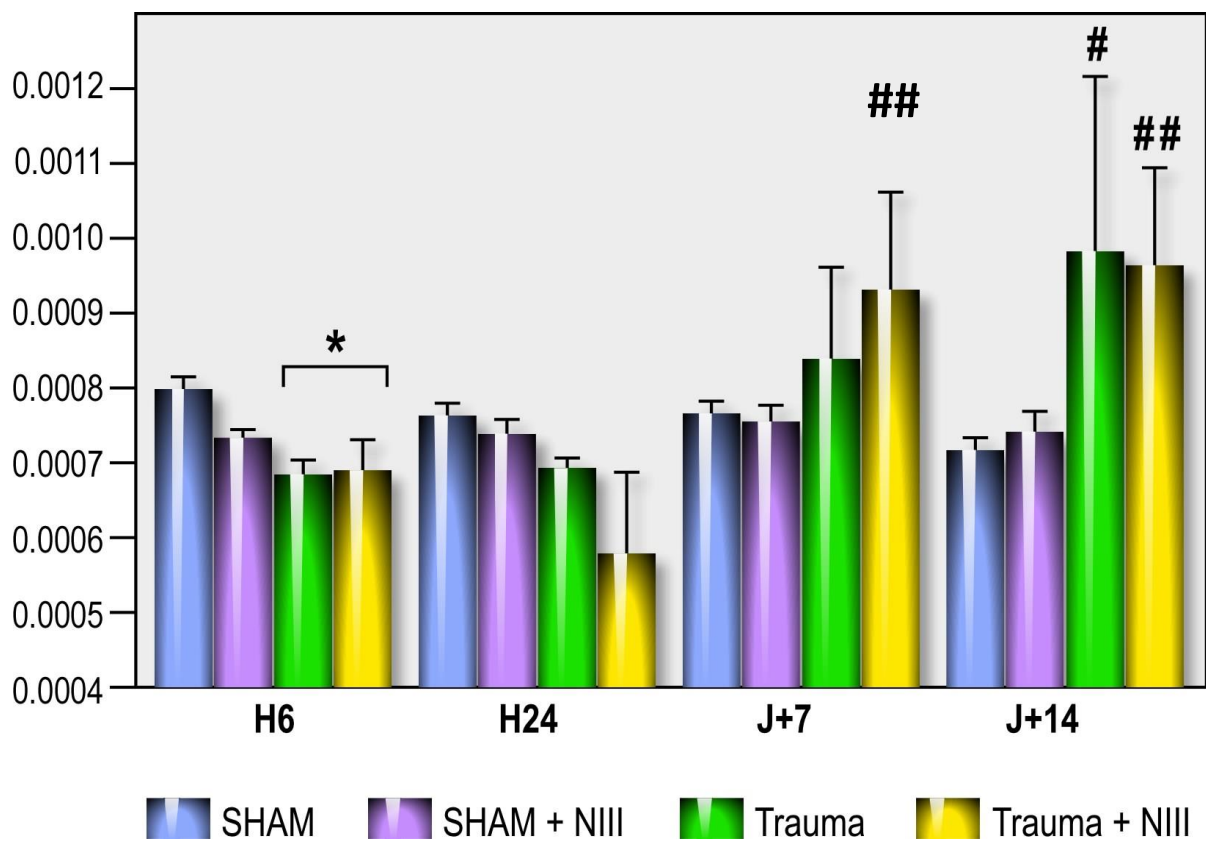


Figure 46: Variation de l'ADC en fonction du temps dans la région d'intérêt 1, au niveau du traumatisme dans le groupe SHAM, SHAM+NIII, Trauma+Placebo et Trauma+NIII (* $p < 0,05$ vs SHAM ; # $p < 0,05$ vs Trauma+Placebo H6 ; ## $p < 0,05$ vs Trauma+NIII H6)

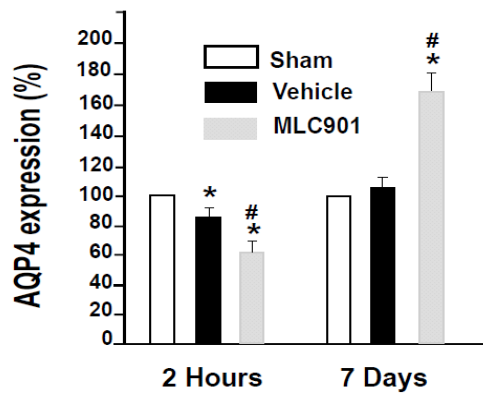
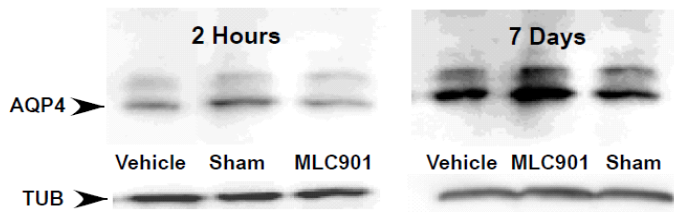
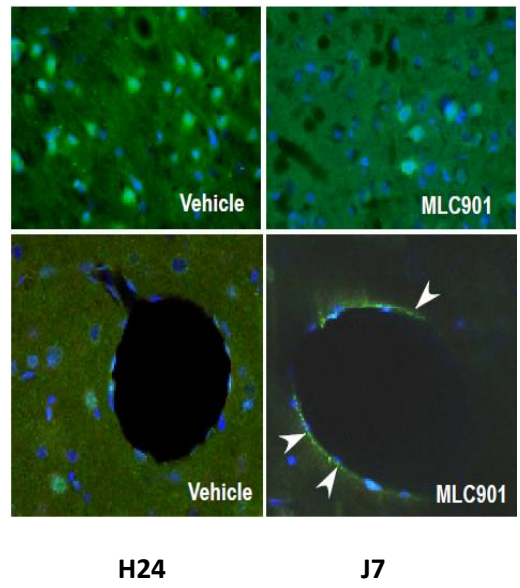


Figure 47: Effet du MLC901 sur l'expression d'AQP4 2 heures et 7 jours post-trauma en Western Blot ($p < 0,05$ vs SHAM et # $p < 0,05$ vs vehicle) et immunomarquage AQP4 (vert, flèches) à H24 et J7 post trauma dans les groupes Placebo et MLC901.*

Effet du MLC901 sur le Débit sanguin cérébral

Les lésions secondaires induites par le traumatisme peuvent être en rapport avec des modifications hémodynamiques cérébrales. Cependant celles-ci ont été jusqu'alors peu étudiées dans la littérature du fait des difficultés d'évaluation du débit sanguin cérébral (CBF). Qian a observé une diminution du débit cérébral, proportionnelle à l'intensité du traumatisme (Qian et al., 1996b). En effet pour des intensités de trauma de 2,7-3,87, la diminution est de 30% de la valeur de base dans les 60 sec et reste déprimé pendant 120mn à 80% de la valeur de base. Pour des intensités plus modérées (1,53-2,33 Atm), la diminution n'est qu'à 95% de la théorique mais persiste pendant 120mn. Il est à noter dans cette étude que tous les groupes (en dehors du G1 : 1,33 Atm) présentent un pic de CBF dans les 5 secondes suivant le traumatisme. A plus long terme, les travaux de Hayward confirment une évolution en 3 phases avec une phase d'hypoperfusion précoce, suivie par une phase hyperdynamique débutant dans les 48h, suivie par une phase d'hypoperfusion tardive touchant le cortex, le thalamus et l'hippocampe (Hayward et al., 2011) (Figure 48). L'IRM par l'utilisation de l'Arterial Spin Labelling (ASL) permet d'évaluer ce paramètre de manière répétée (Hayward et al., 2011). Grâce à une collaboration avec l'équipe CERMEP de Lyon, nous avons évalué l'évolution du CBF sur des animaux traumatisés et traités par le MLC901. Sous anesthésie générale (Isoflurane), et sous monitoring du rythme respiratoire (rythme maintenu entre 62 et 68 cycles /mn permettant d'ajuster l'isoflurane entre 0,7 et 1,7%), les animaux étaient positionnés dans une IRM de 4,7 T en interface avec la console Varian Inova. L'imagerie a été réalisée à 6h, 24h, 7 j et 14j après le traumatisme, selon le protocole antérieurement décrit (Williams et al., 1992). L'imagerie anatomique en T2 était obtenue en utilisant une séquence spin echo, ou le temps d'écho était de 70msec, le temps de répétition de 2,500 millisecondes et le champs de 4x4cm².

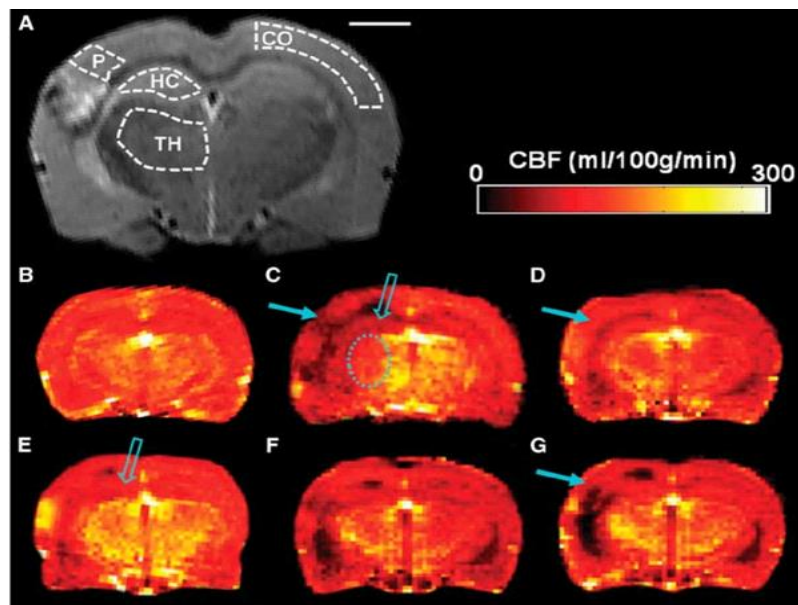


Figure 2 Coronal magnetic resonance imaging (MRI) slices of the rat brain showing anatomic data and cerebral blood flow (CBF) data. (A) Regions of interest (ROIs) drawn on a T₂-weighted image taken from a representative trauma rat 2 weeks after lateral fluidpercussion injury (LFPI). CO, contralateral cortex; HC, hippocampus; P, perilesional cortex; TH, thalamus. Scale bar = 2 mm. CBF maps from (B) a control rat and the representative trauma rat acquired at (C) 6 hours, (D) 24 hours, (E) 48 hours, (F) 1 week, and (G) 2 weeks after traumatic brain injury (TBI). The solid arrow highlights CBF changes in the perilesional cortex. An open arrow highlights ipsilateral hippocampal CBF changes at 6 hours and 2 days after trauma. The dashed oval indicates acute hypoperfusion.

Figure 48: Débit sanguin cérébral post traumatisme par LFPI mesuré en IRM en fonction du temps (Hayward et al.)

On obtient ainsi 15 coupes cérébrales (épaisseurs de 1mm). Le centrage des coupes s'est fait à 3,6mm de la bregma. La durée d'examen est en moyenne de 10,5 mn. Les régions d'intérêt (ROIs) sont définies sur une image anatomique obtenue au cours du même examen. Les ROIs sont celles décrites sur la Figure 45. Le débit sanguin cérébral est quantifié en utilisant une séquence IRM type ASL (Arterial Spin Labelling) (Hayward et al.). Le champ mesuré est de 4x4 cm², 128x128 points, épaisseur de coupe de 2mm, temps de répétition de 6 secondes, temps d'écho=7 millisecondes, nombre d'écho= 16. Au total 24 animaux ont été utilisés pour cette étude, répartis en 4 groupes (SHAM, SHAM, MLC901, TC-Placebo, TC- MLC901). L'intensité de traumatisme était de $3 \pm 0,1$ Atm.

On observe au niveau de la zone lésionnelle, une diminution du CBF, chez les animaux traumatisés à H6 post-trauma, sans différence significative entre les Placebo et MLC901 (Figure 50). Cette phase d'hypoperfusion est suivie par une phase dite "hyperhémique" dans le groupe Placebo à H24. Les animaux TC-MLC901, normalisent leur CBF dès H24, par rapport au groupe SHAM. Au niveau du cortex controlatéral, le CBF est diminué par rapport aux animaux témoins de H6 à H24, et jusqu'à J7 pour les TC-MLC901 (Figure 51). Cette variation de perfusion est également présente au niveau de l'hippocampe homo- et contralatéral entre H6 et H24.

Ces données sont en accord avec les données antérieurement publiées par Hayward (Hayward et al.), mais diffèrent cependant sur quelques points. Alors que leur intensité de trauma était légèrement supérieure à celle utilisée dans notre étude (3,2-3,4 Atm), ils montraient une hypoperfusion à J14 que nous ne retrouvons pas dans notre étude. Par contre, nous retrouvons sur les zones étudiées une hypoperfusion par rapport au groupe SHAM à H24, qu'ils ne mettaient pas en évidence dans leur étude. Une hypothèse pouvant expliquer ces différences pourrait être un niveau initial de CBF plus élevé dans notre étude (150 vs 100 ml/100g/min).

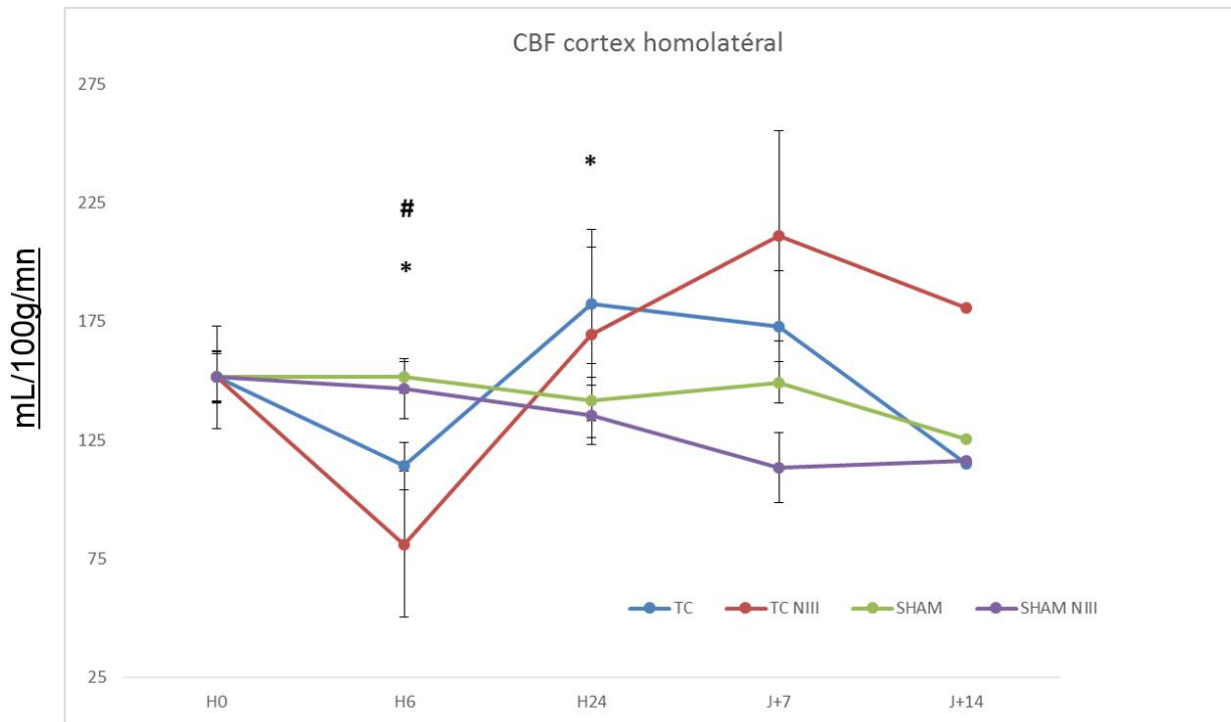


Figure 49 : CBF(SEM) (mL/100g/mn) au niveau de la zone lésionnelle (* $p < 0,05$ SHAM vs TC Placebo ; # $p < 0,05$ SHAM vs TC NIII)

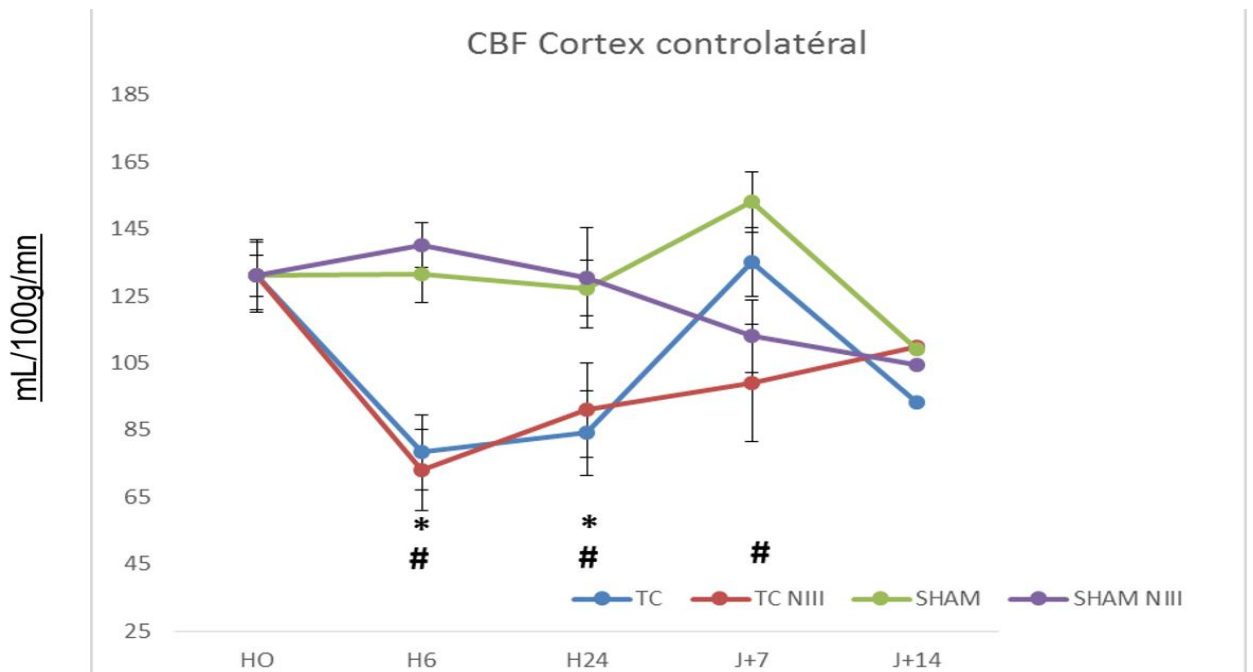


Figure 50 : CBF(SEM) (mL/100g/mn) au niveau du cortex controlatéral (* $p < 0,05$ SHAM vs TC Placebo ; # $p < 0,05$ SHAM vs TC NIII)

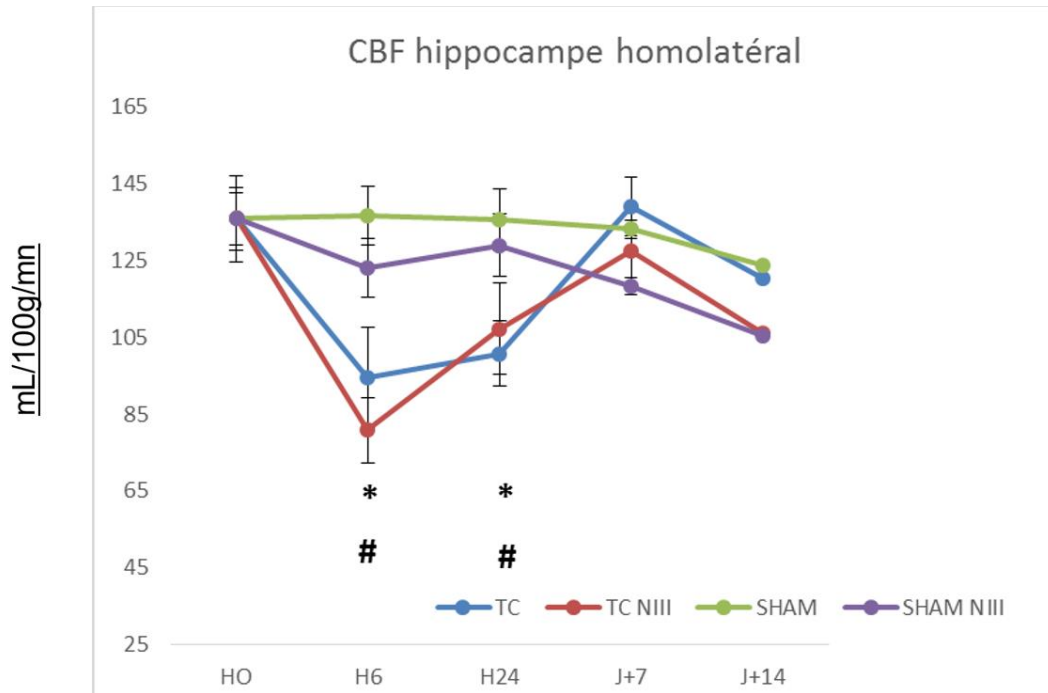


Figure 51 : CBF(SEM) (mL/100g/mn) au niveau de l'hippocampe homolatéral (* $p < 0,05$ SHAM vs TC Placebo ; # $p < 0,05$ SHAM vs TC NIII)

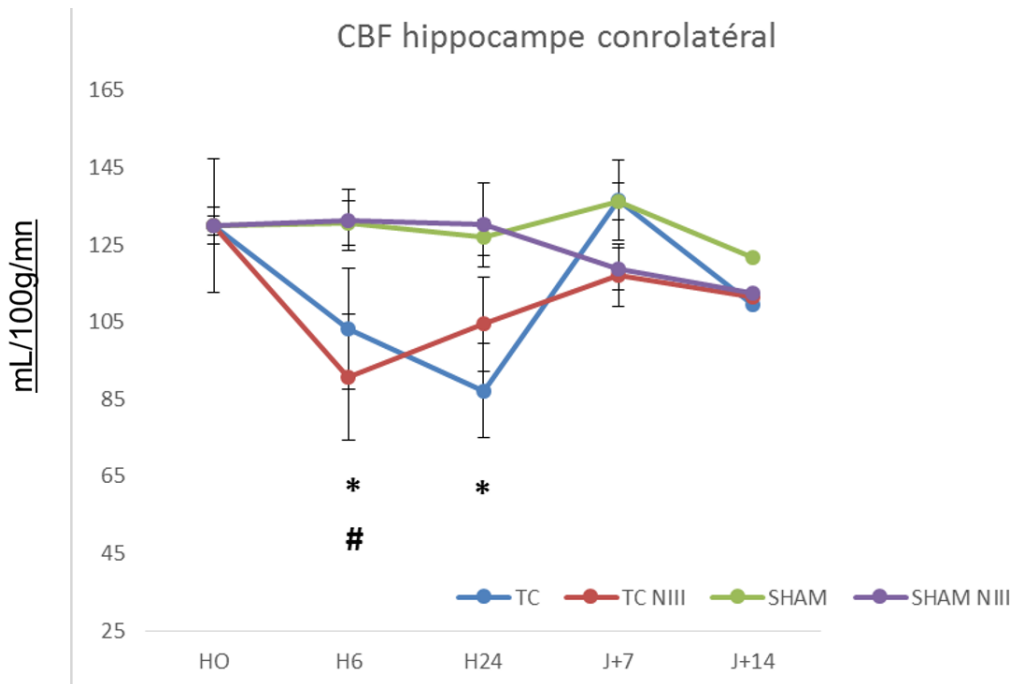


Figure 52 : CBF(SEM) (mL/100g/mn) au niveau de l'hippocampe controlatéral (* $p < 0,05$ SHAM vs TC Placebo ; # $p < 0,05$ SHAM vs TC NIII)

Effet du MLC901 sur la neurogenèse

Immuno Marquage BrDU

Au vue des précédents travaux sur le MLC901, nous avons voulu confirmer son effet neurorégénérateur potentiel sur ce modèle de TC.

L'effet du MLC901 sur la neurogenèse est analysé à J7 et à J21 après traumatisme crânien. Afin de détecter la prolifération cellulaire au niveau du Dentate Gyrus, on effectuait 4 injections de BromodesoxyUridine (BrdU), une base modifiée remplaçant la thymidine de l'ADN lors de la phase S du cycle cellulaire, selon le protocole modifié de Juan Beauquis (Beauquis et al., 2006) à J6 et J20 post-ischémie. Ces injections étaient faites en intrapéritonéale à raison de 75mg/kg par animal en 4 injections espacées de 2h (n=6 par groupe). Le cerveau des animaux était prélevé le lendemain de la dernière injection du BrdU soit J7 et J21 post-trauma comme déjà décrit précédemment. A J7 post-trauma, on observait une augmentation significative du nombre de cellules marquées BrDU chez les animaux traumatisés. Cette augmentation était significativement plus importante pour les animaux traités au MLC901 par rapport au Placebo (332 ± 148 vs $122 \pm 61,1/\text{mm}^3$; $p < 0,05$). A J21 post-trauma, on observait une augmentation du marquage BrDU chez les animaux traumatisés par rapport au groupe SHAM ($43,2 \pm 24,9$ vs $53,2$ vs $20,1/\text{mm}^3$). Le groupe traité MLC901 présentait un nombre de cellules marquées significativement plus important que dans les 2 autres groupes ($126,4 \pm 51,6$ vs $53,2 \pm 20,1/\text{mm}^3$; $p < 0,05$) (Figure 53).

Marquage fluorogold (FLUOROGOLD kit fluorochrome.com ccc 1801 William street, suite 300 Denvers, Colorado 80281 USA) n=9 rats

Emery et al. ont montré une migration des cellules immatures vers la zone CA3 de l'hippocampe suite à un traumatisme crânien (Emery et al., 2005), par la technique du fluorogold. Cette technique d'injection retrograde, associée à un double marquage BrDU est réalisée sur 18 semaines. Elle nous permet de marquer

les nouvelles connexions provenant des cellules immatures, dont la prolifération a été induite par le traumatisme.

A J2, J3, et J4 post-traumatisme les rats sont injectés en intrapéritonéal par du BrDU (75mg/250g ; 4x500µl inj IP/jour). Huit semaines après la dernière injection, sous anesthésie générale et sous stéréotaxie, on réalisait une injection au niveau du CA3 de 2% Fluorogold (10µL). Les animaux étaient sacrifiés 2 semaines après. Les cerveaux étaient ensuite prélevés et découpés au vibratome (40µm), en milieu obscur. Les coupes étaient ensuite traitées selon le protocole suivant (Sun et al., 2007):

- 1- Traiter 20 min HCL 2N RT
- 2- Borate 10 min RT
- 3- Blocking 2,5 % Horse serum 2h RT
- 4- Incuber avec anticorps mouse antiBRDU 1/400 ainsi que rabbit anti fluorogold 1/50000 4h à 4°C
- 5- Rincer pbs 1x
- 6- Incuber anticorps secondaires anti mouse rodamine + anti rabbit Fitc 1h RT
- 7- Rincer pbs 1x
- 8- Monter fluoprep

On observait au microscope confocal un marquage par fluorogold au niveau des nouveaux neurones du dentate gyrus marqués par le double marquage BrDU et Fluorogold. Ils étaient donc intégrés au circuit hippocampique suite au traumatisme. Le traitement par MLC901 stimule cette intégration par une intensité de marquage amplifiée (Figure 54).

Après une lésion cérébrale, on observe une augmentation de la sécrétion des facteurs neurotrophiques, tel BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) et VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Ferrara et al., 2004). Nous avons déjà démontré sur un modèle précédent que BDNF est « up régulé » après une lésion cérébrale (Quintard et al., 2011). Nous nous sommes intéressés au VEGF en post trauma. Pour cela les animaux après traumatisme et traitement par Placebo ou MLC901, comme précédemment décrits, étaient sacrifiés à J7 avec récupération du cortex et de

l'hippocampe pour réalisation d'un dosage VEGF selon technique Western Blot, décrite précédemment.

On observait une augmentation du taux de VEGF au niveau de l'hippocampe des rats traumatisés Placebo par rapport au groupe SHAM. Cette augmentation était significative au niveau de l'hippocampe et du cortex chez les animaux traités par MC901 (Figure 55).

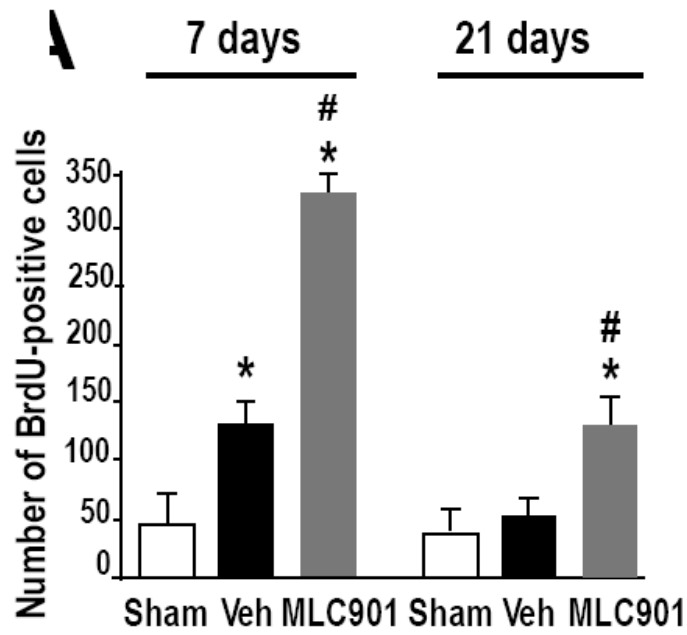


Figure 53: Effet du MLC901 sur la neurogenèse obtenue par Marquage BrDU à J7 et J21 post-trauma

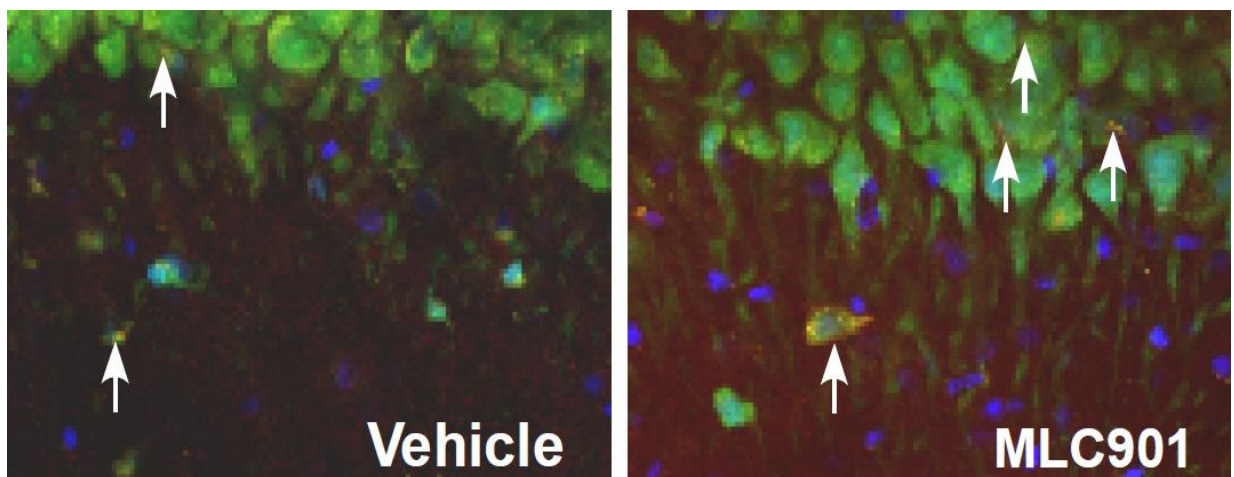


Figure 54: Vue en microscopie confocale du double marquage BrDU- fluorogold montrant la projection des axones des nouveaux neurones formés à la région CA3 de l'hippocampe (flèches).

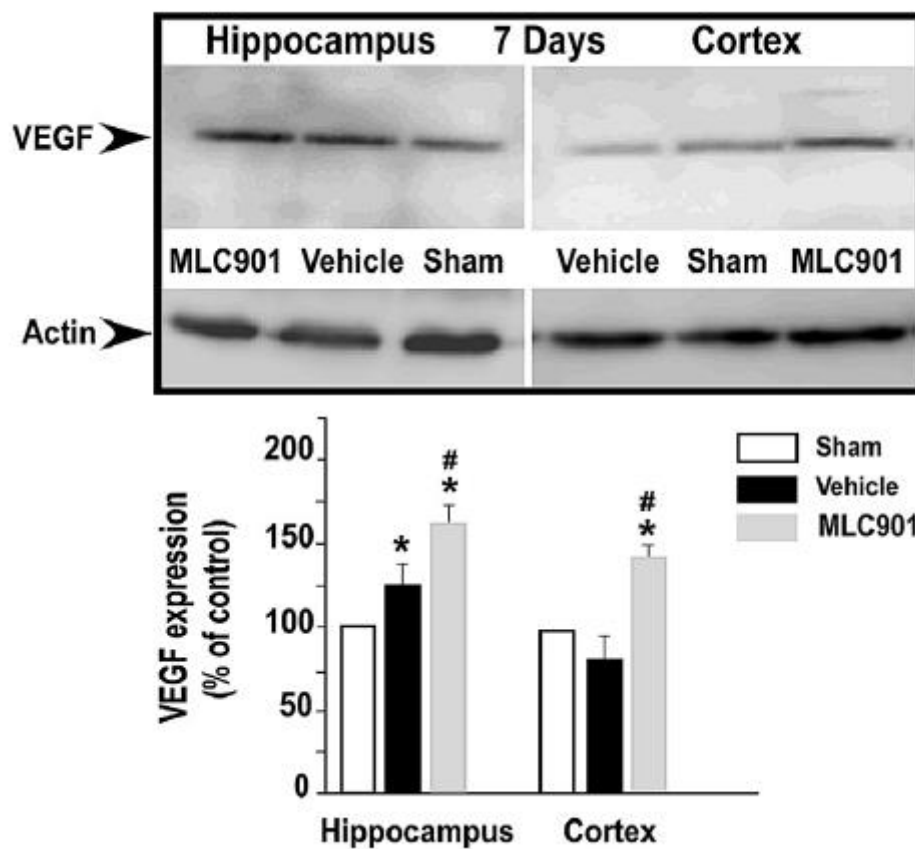


Figure 55 : Western Blot de VEGF au niveau de l'hippocampe et du cortex dans le groupe Placebo et MLC901 (* $p < 0,05$ vs SHAM ; # $p < 0,05$ vs Vehicle)

Effet comportemental du MLC901 sur un modèle de TC par LFPI

Les études comportementales peuvent s'appuyer sur différents tests permettant d'évaluer les conséquences induites par le traumatisme.

On distingue 4 grandes fonctions qui peuvent être évaluées :

- Évaluation de la fonction motrice
- Évaluation du tonus musculaire et des réflexes
- Évaluation de l'intégration vestibulo-motrice
- Évaluation des fonctions cognitives

Nous avons décidé dans notre étude de nous intéresser principalement aux désordres moteurs, aux troubles des fonctions cognitives, et aux perturbations vestibulo-motrices induites par le traumatisme. Nous ne détaillerons donc ici que les tests s'intéressant à ces paramètres (figure 56).

Evaluation des fonctions motrices : Test de la poutre (Beam walk)

Evaluation des atteintes vestibulo-motrices : Test de la poutre (Beam walk)

Evaluation des fonctions cognitives : Piscine de Morris et Reconnaissance d'objet.

Evaluation des fonctions motrices

Le beam walk test

Premier test moteur utilisé chez le rat, permet d'étudier les conséquences motrices d'un traumatisme cortical. Ce test évalue également la coordination du mouvement. L'animal doit traverser une poutre d'1m70 de largeur décroissante, délimitée en 14 segments d'égale longueur, lui permettant de rejoindre un abri sombre (Figure 56).



Beam



Openfield

Figure 56: Tests comportementaux utilisés dans l'étude

L'apprentissage est réalisé avant le traumatisme sur 3 jours avec 3 entraînements par jour, permettant de définir une valeur test pour chaque animal au bout du 3^{ème} jour, puis les animaux sont testés 2 fois à J1, J7, J14 post-trauma. Le délai et le nombre de fautes de pas homo- et contralatéral à la lésion sur la poutre, sont enregistrés par vidéo et analysés à posteriori. Ce test est utilisé de façon courante en traumatologie expérimentale de type LFPI, cependant avec des variantes tel que le *foot fault test*, utilisant une grille de largeur constante et mesurant le nombre d'erreurs de pattes, ou encore des poutres de largeur constante (1,7cm). Selon les modèles utilisés les résultats sont discordants. En effet, sur un modèle type CCI, Moro décrit une altération post-trauma des capacités motrices des rats dès J1 se corrigeant avec le temps pour revenir à leur capacité d'origine à J13 (Moro and Sutton) . A l'opposé, en utilisant le même modèle de traumatisme, Russel, et al. décrivent une altération persistante au-delà de 28 jours, des troubles moteurs chez des rats jeunes, leur faisant souligner l'intérêt de ce genre de test pour l'évaluation précoce et tardive des séquelles motrices post- traumatisme crânien (Russel, 2011). A J+1 ou J+7 on observe une augmentation du nombre d'erreurs au fur et à mesure que l'animal se déplace sur la barre (Figures 55 et 56). Nous ne tiendrons volontairement pas compte des derniers centimètres de la barre, car les fautes de pattes ne sont pas forcément en faveur d'erreurs mais d'un repositionnement pour pénétrer dans l'abri. A J+1, les animaux traumatisés présentent plus de trébuchements au 9^{ème} segment par rapport au groupe SHAM ($p=0,007$). Sur la fin de parcours la différence entre les 2 groupes existe mais perd en significativité. Le MLC901 ne reverse pas cet effet moteur. A J+7, les animaux traumatisés corrigent ce déficit moteur, on ne mesure plus de différence significative entre les groupes, quelque soit le segment étudié (Figure 57).

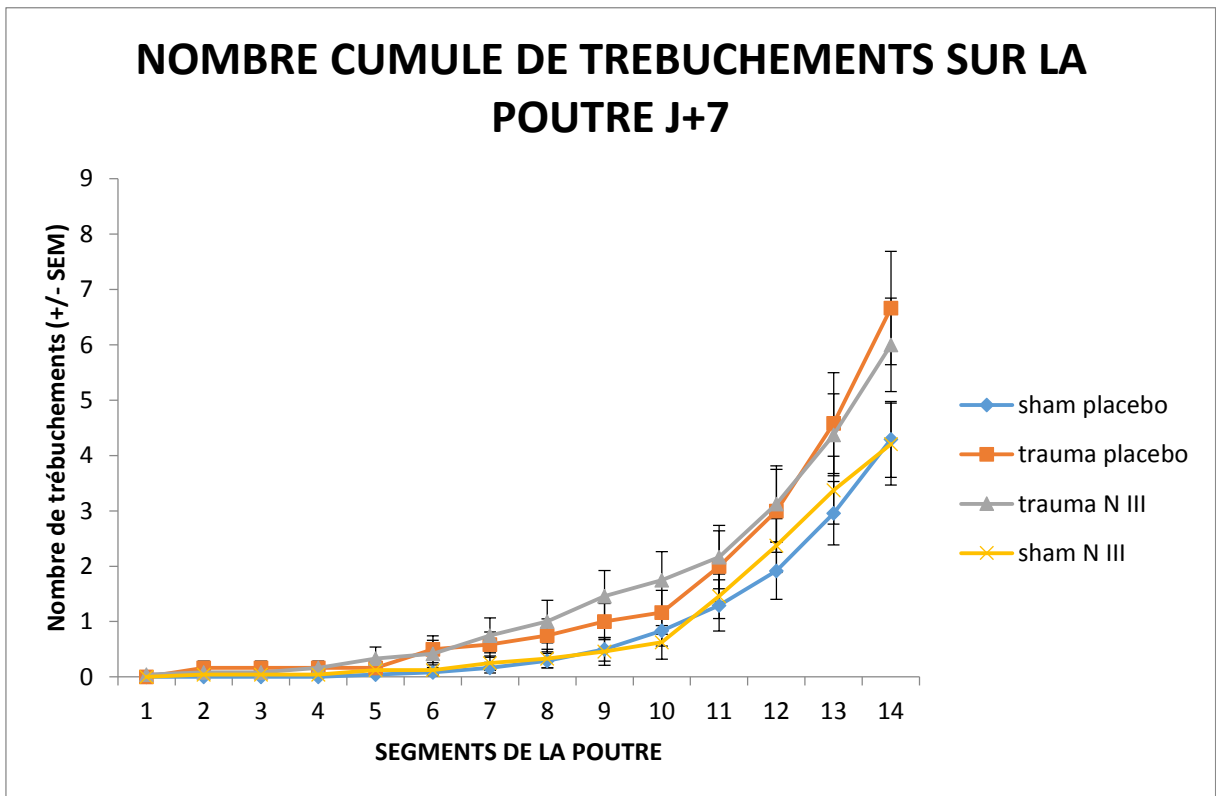
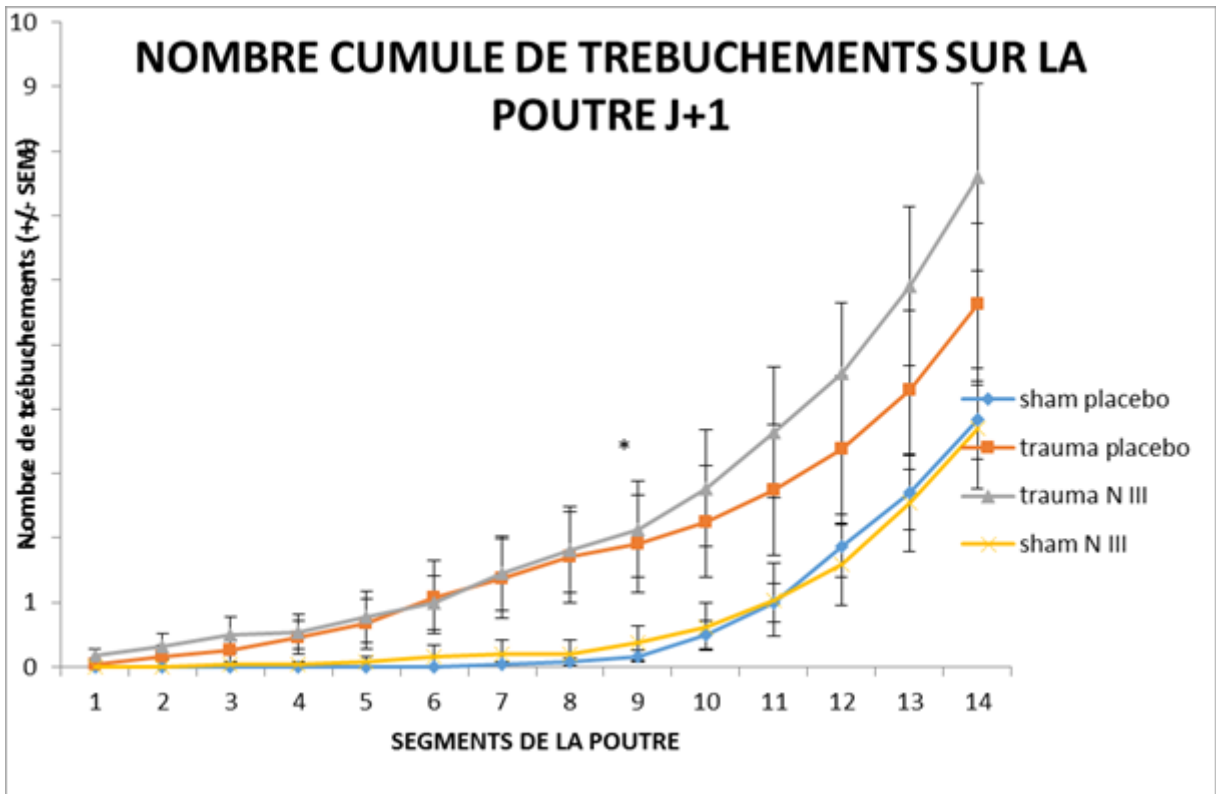


Figure 57: Nombre d'erreurs (moyenne (SEM)) en fonction de la distance parcourue J+1 et J+7 (* $p < 0,05$ trauma vs SHAM dans les groupes Placebo ou NIII)

Evaluation des fonctions cognitives

Test de la piscine de Morris

Le test de la piscine de Morris a comme objectif de tester les capacités d'apprentissage et de mémorisation spatiales des rats. Il est testé 3 semaines après le traumatisme. Il consiste à apprendre au rat à localiser une plateforme située 1,5cm sous le niveau de l'eau (rendue opaque) dans une piscine de diamètre variable. Des marqueurs spatiaux sont marqués au mur et visibles de toutes les zones de la piscine. L'analyse vidéo s'intéresse à la distance parcourue par l'animal, ainsi que la latence à laquelle la plateforme est retrouvée. La 1^{ère} phase débutée à la 3^{ème} semaine post-trauma, repose sur une période de 4 jours consécutifs avec 4 tests par jour, espacés de 2h, où l'animal apprend à situer la plateforme. S'il n'y arrive pas au bout de 60s, il est positionné sur la plateforme. Une fois sur celle-ci il y reste 30 s, puis est séché, placé sous une lampe chauffante avant d'être remis dans sa cage d'origine. La seconde phase, ou test de remémoration, réalisée 72h après, consiste à retirer la plateforme et à mesurer au cours de 4 essais, espacés de 2h, d'une durée de 60 s chacun, le temps passé au niveau de l'ancienne localisation de la plateforme. Les travaux de Pierce, utilisant des trauma de forte intensité, ont retrouvé des troubles de l'apprentissage spatial persistant jusqu'à 1 an post-trauma. Par contre il ne retrouve pas de troubles de la remémoration par rapport à des animaux témoins, 2 jours après l'apprentissage. Ces différences ont été retrouvées dans d'autres études. Ces travaux vont à l'encontre de ceux de Sanders, retrouvant une altération de l'apprentissage spatial et de la remémoration selon l'intensité du traumatisme (Sanders et al., 1999).

Après un apprentissage de 4 jours, les rats sont soumis à un test de remémoration. Ce test réalisé à J21 et J28 post-traumatisme (n=3 par groupe). Le temps passé dans

la zone 1, contenant la plate forme est significativement plus important pour chaque groupe de rats étudiés par rapport aux autres zones d'exploration à J21. Il n'existe pas de différence entre les groupes. Cette préférence disparaît à J28 (Figure 59). La latence pour retrouver la plate forme est de $1,90 \pm 0,14$ sec et de $2,8 \pm 0,2$ sec pour les animaux SHAM, respectivement à J21 et J28. Le traumatisme crânien induit un allongement de ce temps de latence significatif et persistant à J28 ($2,4 \pm 0,4$ sec et $4 \pm 0,35$ sec ; $p < 0,05$). Il n'existe pas de différence significative entre le groupe TC+Placebo et le groupe TC+MLC. Cette exploration réalisée de manière retardée par rapport au traumatisme (J21 et J28), ne retrouve pas de différence entre les groupes quelque soit le quadrat étudié en terme de distance parcourue, pour ces différents groupes de rats percutés avec une intensité de traumatisme sévère.

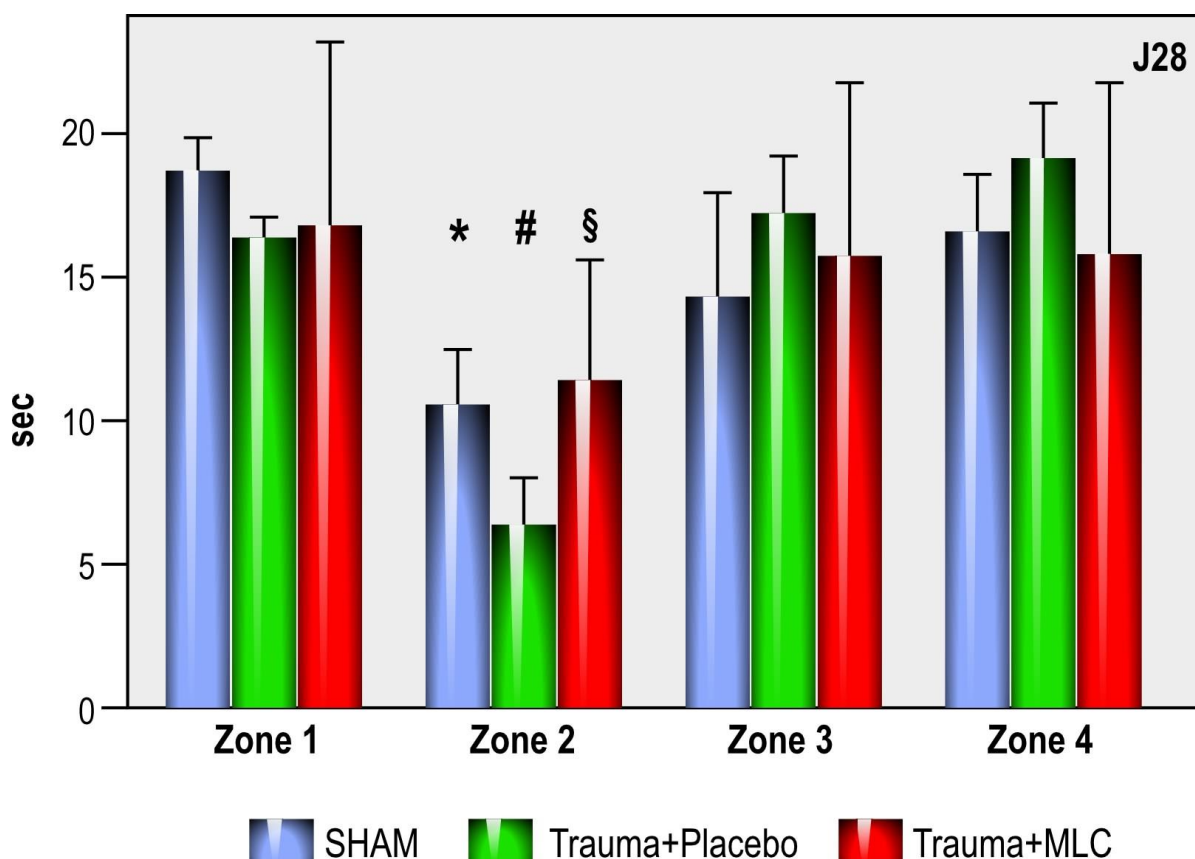
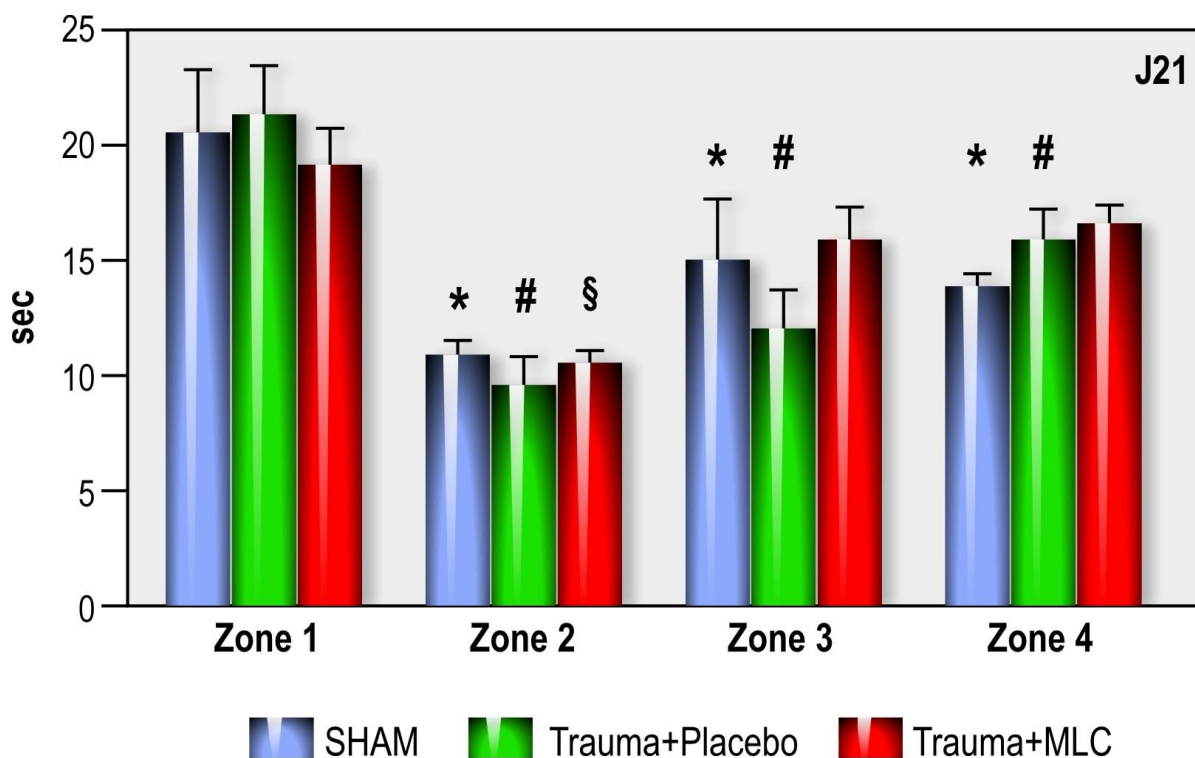


Figure 58 : Temps passé (s ± SEM) dans les différents quadrants selon le groupe de rat à J21 et J28 (* $p < 0,05$ vs SHAM zone 1 ; # $p < 0,05$ vs TC+Placebo zone 1 ; § $p < 0,05$ vs TC+MLC zone 1)

Test de mémoire de type épisodique: reconnaissance de position et d'ordre de présentation d'objets « the episodic –like memory task »

Afin d'étudier les capacités cognitives de nos rats, nous avons utilisé une tâche élaborée par Dere et al. et modifiée par Barbosa (Dere et al., 2005), visant à évaluer les différents aspects de la mémoire épisodique chez les rongeurs ("quoi" "quand""ou" : "What-When-Where"). L'appareil est un openfield en bois peint en couleur lavande, 75 cm x75 cmx 30 cm, et indirectement éclairée par deux lampes halogènes (50 lux). Il est divisé en une zone centrale (45 cm x 45 cm) et une zone périphérique. Des repères géométriques sont disposés en hauteur autour de l'appareil, permettant une auto-localisation pour le rat. Six groupes différents (forme, taille, couleur) de 4 objets identiques ont été utilisés dans cette expérience. Deux groupes d'objets étaient utilisés par séance. Ils peuvent être placés en 5 positions possibles : NO, NE, SO, SE, S (Figure 60). L'appareil est nettoyé avec 10% solution d'alcool après chaque essai. Toutes les expériences sont enregistrées par une caméra placée à 1,5 m au-dessus de l'open field. Le comportement des rats est analysé par le logiciel de trajectométrie ANY-maze (Anymaze, Stoelting, Etats-Unis).

La semaine avant la chirurgie, chaque rat a été introduit dans l'open field 10 min par jour pendant trois jours consécutifs pour les habituer au milieu. L'ensemble du protocole utilisé est résumé sur la Figure 60.

La tâche de reconnaissance d'objets était réalisée en trois phases: essais 1 et 2 et test. Chacun des essais a duré 7 minutes. Dans l'essai 1, les rats étaient soumis à une exploration de 4 objets identiques placés dans l'open field (NO, SE, SO, S). Une heure et demie après cet essai (12h-13h) un deuxième essai était réalisé avec un deuxième groupe d'objets identiques. Trois d'entre eux ont été placés aux mêmes endroits que trois de la première série (NO, SO, SE), tandis que le dernier était sur un nouvel emplacement (NE). Pour le test, effectué 3 heures plus tard, deux objets de chacun des deux ensembles ont été placés dans l'openfield, afin qu'ils reproduisent

la même disposition spatiale que pour l'essai 2. L'un des objets anciens (objets d'essai 1) a été mise à sa position initiale (SO), tandis que l'autre a été déplacé à l'emplacement d'un des objets de l'essai 2 (NE). Les 2 autres objets ont été laissés aux emplacements restants (NO et SE). Un rat explorait un objet quand il reniflait clairement celui ci, même s'il n'y avait pas de contact. Les temps d'exploration totaux de l'ensemble des objets ont été calculés pour chaque essai. Lors de la réalisation du test, la préférence pour les objets anciens (essai 1) et particulièrement pour l'objet ancien déplacé était analysée. Les indices suivants étaient calculés :

-préférence pour old objects: $(\text{temps d'exploration des objets anciens} - \text{temps d'exploration des objets récents}) / \text{temps d'exploration total}$

-préférence pour objet déplacé: $(\text{temps d'exploration de l'objet ancien déplacé} - \text{temps d'exploration de l'objet ancien non-déplacé}) / \text{temps d'exploration des 2 objets anciens}$.

Pour éviter tout biais dû à l'activité d'exploration insuffisante, les rats explorant l'ensemble des objets pendant moins de 10 secondes ou présentant une activité motrice inférieure à 3 mètres ont été écartés de l'analyse. Toutes les expériences ont été réalisées avec un bruit de fond constant.

Activité exploratoire (Figure 61)

On observe que les 2 groupes TC, avec ou sans traitement ont une activité exploratoire de tous les objets diminuée comparée aux 2 groupes SHAM correspondants durant les essais ("samples") (Fig. 61; $U=15$, $**P<0.01$ for Vehicle-TBI rats). Cette chute d'activité exploratoire est aussi observée durant le test, mais significative que dans le groupe MLC901-TBI (Figure 61); Les animaux prennent moins de temps à explorer les objets pendant la phase test que la phase essais. Cela est certainement dû à l'habituation à l'environnement expérimental au fil du temps. Cette différence est significative pour les 4 groupes: Vehicle-Sham: $T=8$; $^{\$}P<0.05$ / MLC901-Sham: $T=0$; $^{\$}P<0.01$ /Vehicle-TBI: $T=2$; $^{\$}P<0.01$ /MLC901-TBI: $T=1$; $^{\$}P<0.05$.

Analyse de la mémoire temporelle (Figure 62)

Dans cette analyse les 2 groupes Contrôles" ("Sham") montre une préférence significative pour les objets "anciens" (Fig. 62; Vehicle-Sham: $U=55$; $^{\#\#}P<0.01$ / MLC901-Sham: $U=65$; $^{\#\#}P<0.01$). Il n'y a pas de différence significative (Fig. 62; $U=35$; $P>0.05$), quand on compare les rats Vehicule-Sham aux rats MLC901-sham, suggérant une absence d'effet drogue sur les animaux Sham. Le trauma crânien abolit totalement la préférence pour les objets "anciens". Les rats traités Vehicule n'arrivent pas à discriminer entre les 2 objets "anciens" et les 2 objets "nouveaux" (Fig. 62; $U=42.5$; $P>0.05$). De façon très intéressante, le MLC901 reverse totalement ce déficit sévère et restaure la performance des rats MLC901-TBI au niveau de celle observée chez les rats contrôles (Fig. 62; $U=42$; $^{\#}P<0.05$). De plus, l'index de préférence pour les objets "anciens" est significativement plus grand chez les rats TBI-MLC901 que chez les rats TBI-Vehicule ($^{\$}P<0.05$). Ces résultats montrent que le MLC901 permet la récupération de la mémoire temporelle, qui est perturbée après un trauma crânien. En terme de mémoire spatiale (localisation de l'objet "non déplacé" par rapport à l'objet "déplacé"), les rats traités "vehicule", avec ou sans trauma ne montrent de préférence pour aucun des objets "anciens" (Fig. 62 Inset; Vehicle-Sham: $U=21$; $P>0.05$ /Vehicle-TBI: $U=45$; $P>0.05$). A l'inverse, les 2 groupes de rats, Sham et les animaux traumatisés, traités au MLC901 discriminent spatialement entre les 2 objets

"anciens" avec un niveau similaire de performance. Ils montrent une préférence pour les objets "non-déplacés" (Fig. 62 Inset; préférence pour l'objet "non déplacé" *versus* l'objet "déplacé": MLC901-Sham: $U=48$; $\#P<0.05$ / MLC901-TBI: $U=42$; $\#P<0.05$). Ces résultats montrent que le MLC901 lui-même a un effet positif sur la mémoire spatiale, qui est maintenue chez les rats traumatisés.

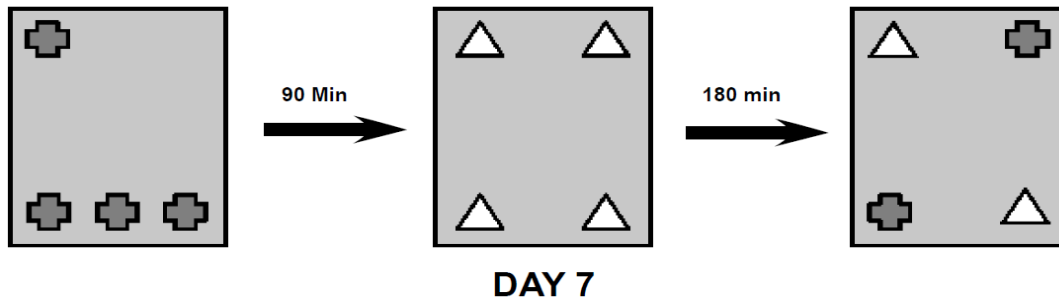


Figure 59: Protocole utilisé pour la reconnaissance d'objet à J+7

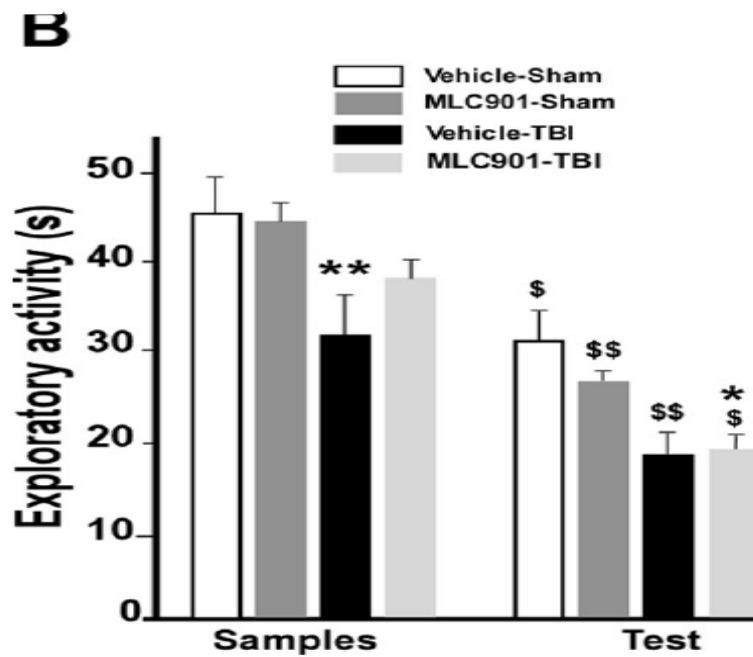


Figure 60: Activité exploratoire (moyenne±SEM) à J+7

**comparaison Vehicle SHAM vs Vehicle TBI ; *MLC901-TBI vs Vehicle SHAM

\$comparaison vs samples \$<0,05 ; \$\$<0,01.

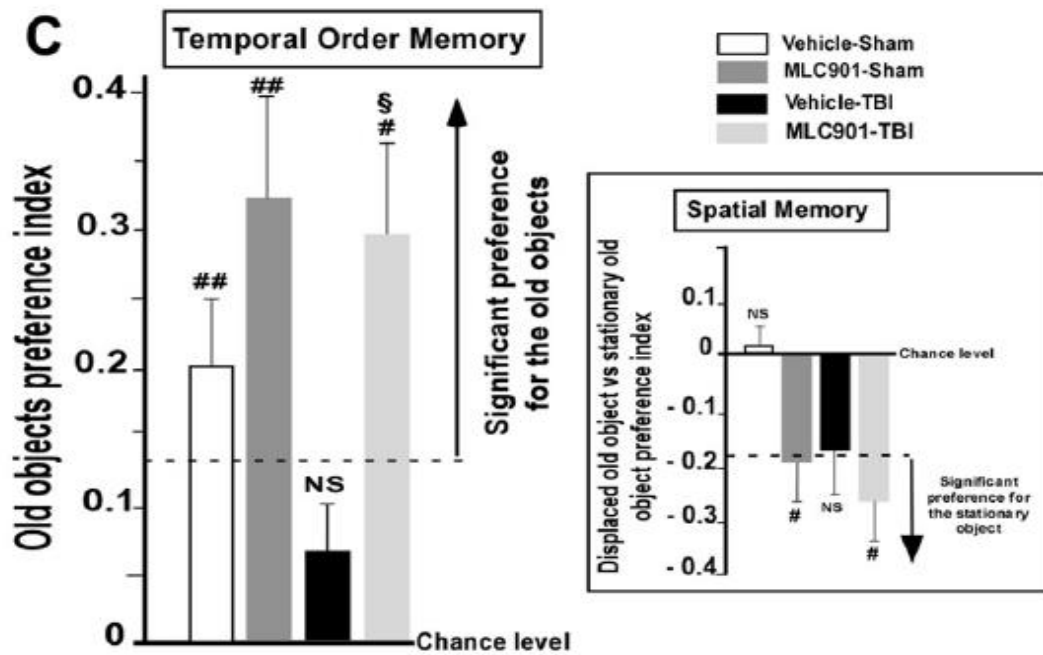


Figure 61: Mémorisation temporelle et spatiale à J+7
 ## vs hazard $p < 0,01$; # vs hazard $p < 0,05$ § vs Vehicle TBI

DISCUSSION

Ce travail confirme dans un modèle de traumatologie, l'effet neuroprotecteur et neurorégénérateur qui avait été décrit précédemment sur deux modèles ischémiques (Heurteaux et al., 2010; Quintard et al., 2011). Ce travail est le troisième d'une série s'étant intéressée à l'ischémie focale et globale. Il a la particularité, par rapport aux deux précédentes études, d'élargir les investigations de l'effet du produit sur l'atteinte vasculaire grâce à une collaboration développée avec la plateforme imagerie CERMEP, Lyon. En effet à côté des données histologiques, réalisées dans notre unité, nous avons également associé des données radiologiques, permettant d'approcher l'action vasculaire et cognitivo-comportementale du produit, qui donnent une approche complémentaire aux données précédemment décrites.

Notre travail a souligné les différentes voies d'action du produit et certaines voies biomoléculaires (Pi3k-Akt, BDNF,...) ont été précédemment décrites. Il est cependant certain que ces études ont identifié de grands mécanismes induits dans la neuroprotection et la neurorégénération, mais ne se sont pas encore intéressés à l'ensemble des cascades biomoléculaires, qui en sont responsables, comme la neuroinflammation par exemple. Cela fera partie d'autres études menées sur le sujet. Comme dans les modèles d'ischémie, nous démontrons l'action pléiomorphe du produit faisant s'associer des vertus neuroprotectrices, en limitant l'étendue des lésions, ou en limitant l'œdème post-traumatique, mais également neurorégénératrices, avec mise en évidence d'une stimulation de la neurogenèse ou d'une stimulation axonale. L'œdème cérébral est un événement important dans la prise en charge des traumatismes cérébraux. Nous montrons dans cette étude que le MLC901 permettrait de limiter cet oedème. L'étude IRM permet de mieux caractériser celui-ci au niveau de la zone lésionnelle. En effet, comme nous l'avons précisé précédemment, celui-ci peut se décomposer en 2 phases successives, une phase cytotoxique précoce, caractérisée par un ADC bas, puis une phase vasogénique plus tardive, avec un ADC élevé. Le MLC901 dans cette étude semble

limiter la phase cytotoxique précoce par rapport au groupe Placebo. Les aquaporines jouent un rôle important dans cette étape, raison pour laquelle nous nous sommes intéressés à cette protéine. Des travaux antérieurs sur des modèles différents ont démontré le rôle variable que pouvait présenter l'aquaporine 4 au cours de l'évolution de l'œdème (Badaut et al., 2011; Badaut et al., 2007). En effet, alors que l'inhibition de la synthèse de la protéine semble bénéfique à la phase cytotoxique, celle-ci semble délétère à la phase tardive vasogénique, faisant ressortir son rôle dans la clairance hydrique tardive. Par rapport au groupe témoin, notre travail confirme une action sur la synthèse d'aquaporine au cours du temps avec une inhibition initiale à H2 post-trauma, puis une augmentation à J7 du traumatisme. L'immunomarquage retrouve une augmentation du marquage AQP4 au niveau périvasculaire à J7, confirmant les données antérieurement publiées et s'intégrant dans le rôle de résorption de l'œdème à la phase tardive du trauma.

L'analyse radiologique, réalisée sur le modèle TC a permis également de souligner l'impact du traumatisme sur la vascularisation cérébrale. Notre travail n'a pas retrouvé d'action du MLC901 sur les variations de débit induites par le traumatisme. Mais des expériences de laser-doppler réalisées au laboratoire analysant l'effet du MLC901 sur le débit sanguin cérébral après injection intraveineuse du MLC901 chez des rats contrôles sains montrent un effet vasodilatateur du MLC901 (résultats non présentés). De plus, cette expérience radiologique nous a permis de comparer les données IRM à celles histologiques en termes de définition des zones de souffrance cérébrale et démontre le caractère très imparfait de ces dernières, ce qui a été peu rapporté dans la littérature jusqu'alors.

Les résultats concernant les tests comportementaux méritent également que nous nous y attardions. Alors que les tests comportementaux réalisés dans le modèle d'ischémie globale confirment les effets bénéfiques du produit aussi bien moteurs que cognitifs, les résultats obtenus dans le modèle traumatologique ouvrent la discussion. Les effets du traumatisme, comme nous le montrons dans ce travail sont de différentes natures. Tout d'abord des troubles moteurs, avec en particulier, dans

l'épreuve de la poutre, un déficit retrouvé par l'augmentation significative des erreurs de positionnement de pattes réalisées à mi parcours de poutre. Cependant, le traitement par MLC901 ne modifie pas ce déficit moteur. On observe également une atteinte cognitive post-TC touchant principalement la mémoire évaluée jusqu'à J28 par l'étude comportementale dans la piscine de Morris. Nous ne retrouvons pas d'effet du MLC901, dans ce modèle comme décrit dans l'ischémie globale.

L'originalité de la seconde partie du travail a été de s'intéresser à décomposer la composante mnésique en mémoire de localisation spatiale et temporelle par l'utilisation d'un test de reconnaissance d'objet. A notre connaissance, c'est la première fois que ce test est réalisé sur un groupe d'animaux ayant été soumis à un traumatisme crânien par percussion liquidienne latérale. Aux vues des résultats présentés dans ce protocole, il semble que le traumatisme induise une altération franche de la mémoire temporelle, qui peut être améliorée par l'utilisation du MLC901. Les résultats sont plus contrastés concernant la mémoire spatiale, plusieurs explications peuvent répondre à cette question. Tout d'abord, le délai prolongé entre les apprentissages et les tests. Deuxièmement, la mobilisation somme toute limitée de l'objet du fait de la taille de l'Open field, ainsi que le fait que le déplacement de l'objet se faisait sur le site d'un objet antérieur. Enfin, on peut imaginer également que les repères placés en dehors de l'open field étaient potentiellement en dehors de la vision du rat et qu'il ne pouvait donc se repérer ainsi. La mémoire épisodique est un mécanisme complexe associant des structures réceptrices à des structures intégratrices comme l'hippocampe, ainsi qu'à des structures de stockage cortical. L'action du MLC901 sur l'ensemble de ces structures, comme nous l'avons démontré dans notre étude histologique peut expliquer l'effet restaurateur du MLC901, particulièrement sur la mémoire temporelle. L'association des résultats histologiques rapportés dans ce travail nous amène à réfléchir sur ces circuits, du fait du remodelage induit par le MLC901 au niveau de l'hippocampe, comme retrouvé par l'étude fluorogold que nous avons

réalisée. L'étude du système temporal antérieur et postéro medial en histologie serait également intéressant à exploiter dans ce domaine.

Récemment une étude similaire à la notre a été publiée utilisant le modèle de LFPI chez le rat avec des intensités de traumatisme à 2,2 Atm (Tsai M. et al., 2014). Les animaux recevaient en injection intrapéritonéale le MLC 601 à 1h ou 4j post traumatisme. Dans leur étude le groupe traité précocement avait le meilleur bénéfice du traitement évalué sur l'étendue lésionnelle mesurée par la technique TTC (cf supra). Les animaux traités par le MLC601 présentaient également une diminution de l'apoptose (marquage TUNEL) et une amélioration des tests fonctionnels (Cylindre, foot fault test) persistant dans le temps. Cette dernière observation est intéressante car l'ensemble des études sur le comportement n'ont jusqu'alors jamais montré un effet prolongé dans le temps (21j). L'originalité de ce travail a surtout été de démontrer une diminution de la réponse gliale (mesurée par marquage Iba1+TNF α +DAPI) chez les animaux traités par MLC601, ouvrant une nouvelle voie d'action du produit. Nous avons sur un petit collectif de rats observés des résultats sensiblement identiques à ceux présentés, par marquage glial (résultats non présentés). On remarque que dans cette recherche les doses de traitement étaient plus élevées que dans notre étude puisque lors de l'injection précoce, ils démontraient une action sur l'étendue lésionnelle pour des doses de 0,4mg/kg alors que dans notre étude nous avons des doses de 0,074mg/kg pour des délais d'injection identiques. Nous avons choisi la dose la plus basse afin d'obtenir un effet du produit dans notre groupe comme démontré précédemment. Cette étude est à notre connaissance la seule s'étant intéressée comme nous, à l'action du MLC sur le traumatisme cranien expérimental. L'ensemble des résultats présentés par cette équipe de Taiwan, qui confirme l'effet positif du MLC face à cette pathologie est un argument de plus en faveur de l'utilisation du MLC601/901 en thérapeutique face à des pathologies neurologiques.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERPECTIVES

Nous démontrons donc dans ce travail l'effet pléiomorphe du MLC901 sur 2 modèles expérimentaux : ischémique et traumatologique. La particularité de ces études est qu'elles font suite à des études cliniques qui ont démontré l'efficacité du produit, en particulier dans le domaine des AVC, au sein d'une Médecine Chinoise basée sur l'expérience clinique (Chen et al., 2009). Cette approche est donc originale dans le sens, que nous partons d'un postulat d'efficacité du produit avant de comprendre ses mécanismes d'action, ce qui est l'opposé de notre vision occidentale, mais également que nous essayons de rapprocher deux concepts médicaux opposés : d'un côté une Médecine Occidentale basée sur les preuves expérimentales et la connaissance des mécanismes, et d'un autre côté une Médecine Chinoise fondée sur l'expérience clinique développée depuis plusieurs siècles. Cette approche radicalement opposée à l'approche traditionnelle "données expérimentales avant passage à l'humain" permet ainsi de réhabiliter une Médecine Chinoise souvent considérée comme une "exo-médecine". La raison de cet intérêt actuel est essentiellement due à un constat d'inefficacité de notre approche traditionnelle par rapport à des pathologies fréquentes touchant des populations souvent actives avec un réel impact économique.

Les études cliniques chinoises, fortes d'une longue expérience, souffrent cependant de biais méthodologiques importants empêchant de conclure sur l'efficacité du produit simplement à partir de celles-ci. Leurs résultats ouvrent des voies d'espoir. Nos données expérimentales confortent ces observations cliniques mais nous amèneront à vouloir contrôler les résultats observés cliniquement selon la méthodologie scientifique habituellement utilisée en Occident. Or l'on sait que beaucoup de molécules neuroprotectrices en études précliniques se sont malheureusement révélées être un échec lors du passage en clinique humaine.

Les raisons de ces échecs sont multiples. On peut citer par exemple l'extrême hétérogénéité des lésions induites, en particulier dans le cas du traumatisme crânien, qui rend l'homogénéité des inclusions difficile, en clinique humaine à la différence de l'expérimentation animale où les lésions sont reproductibles. Par conséquent, afin

d'optimiser les chances de transfert de ces données expérimentales vers des données potentiellement vérifiables chez l'homme, différentes règles devraient être vérifiées avant de passer à une expérimentation clinique :

Tout d'abord, il serait essentiel de pouvoir contrôler ces données sur d'autres modèles animaux (mouton, cochon,...), dont la masse cérébrale se rapproche plus de celle de l'homme que sur modèle murin, avant tout passage chez l'humain.

Une analyse pharmacocinétique et pharmacodynamique serait nécessaire afin de connaître les différentes voies métaboliques de ce traitement. La notion de "timing" d'administration rentre dans cette discussion. Il a été démontré des modifications du débit sanguin cérébral au décours de ces stress neurologiques, devant nous amener à réfléchir à la biodisponibilité du produit dans de telles circonstances (Marklund et al., 2006).

La prise en charge du traumatisme crânien ou de l'arrêt cardiocirculatoire est une prise en charge en grande partie médicale pouvant mettre en jeu différentes molécules (sédation, ...), mais également différentes techniques (hypothermie,...), dont l'impact sur la pharmacodynamie du produit n'est pas connu. Une analyse en condition serait donc nécessaire.

L'association de comorbidités (fractures,...) est chose classique dans le cadre de la prise en charge de patients, en particulier traumatisés crâniens. Il a été montré récemment que l'association lésionnelle avait un impact direct sur les lésions induites par le trauma (Degos, 2013).

De plus les animaux utilisés dans les études précliniques sont le plus souvent des animaux jeunes. Différentes études ont montré les différences potentiellement rencontrées sur des animaux d'âges différents, ce qui est rarement réalisé en pratique.

Enfin, il serait intéressant d'évaluer les séquelles tardives des différents animaux. Actuellement, cette pratique est très peu utilisée sur modèle experimental animal du fait de difficultés techniques. Très souvent, l'animal récupère relativement rapidement dans les modèles expérimentaux.

Le caractère très polyvalent du produit pourrait venir du fait que ce produit associe différents composés végétaux qui peuvent avoir des effets très différents. Alors que l'analyse individuelle des différents composés pourrait permettre de comprendre comment et où pourrait agir le MLC901, elle ne permettrait cependant pas de connaître le principe actif de ce produit. En effet, il est fortement probable qu'il n'existe pas "un" principe actif mais "plusieurs" pouvant expliquer cette action. De plus, le caractère additif et potentiellement synergique des produits entre eux, ne fait que renforcer la complexité d'approche de ce produit. Cependant il est clair que cette étape sera nécessaire avant toute étape de passage à l'homme dans la Médecine Occidentale.

L'étude CHIMES, qui s'est intéressée à l'effet du produit sur une population de patients victimes d'accident vasculaire cérébral est le témoin de ce type de problème. En effet, en essayant de démontrer l'action du produit sur une population très large de patients victimes d'AVC, avant d'avoir pu répondre à l'ensemble des points précédents n'a pas retrouvé d'effet significatif du produit sur le pronostic des patients. Cependant, les études en sous- groupes montrent que le MLC601 est efficace dans les AVC les plus sévères et semblent mettre en évidence que les notions de timing d'administration et de gravité initiale pourraient avoir un impact important sur les résultats. De plus, l'analyse des résultats a permis de retrouver, de manière fortuite, un rôle du MLC601 sur la prévention des événements secondaires vasculaires pouvant survenir en post-AVC (Chen et al., 2013b). Ceci nous amène à réfléchir à l'action purement vasculaire du produit et à en disséquer ses mécanismes. L'étude BRAINS (Brain Injury and NeuroAid Supplementation) est actuellement en cours en Nouvelle Zélande, et s'intéresse à l'action du MLC901 sur des patients victimes d'un traumatisme léger. Cette étude randomisée en double aveugle, réalisée chez 140 patients victimes de traumatismes bénins ou modérés, présentant des troubles cognitifs au cours des 3 semaines suivant le traumatisme s'intéresse aux conséquences fonctionnelles (troubles cognitifs, humeurs,...) à J30, J90, J180 et

J270 post randomisation. Calquée sur les données de l'ischémie, le traitement est une nouvelle fois donné de façon tardive par rapport à l'évènement, sur une population ciblée présentant des troubles cognitifs. Ces données ne permettront donc pas de statuer sur l'action neuroprotectrice du produit car très tardive par rapport à l'évènement, mais plus sur le traitement « d'appoint » de ce traitement en phase de réhabilitation. Cependant la méthodologie stricte de randomisation et de recueil des données est un gage de qualité vis-à-vis des résultats qui seront trouvés. Ce travail souligne, une nouvelle fois, l'intérêt que ce produit engendre pour des pathologies associées à de lourdes séquelles. L'action dans les maladies neurodégénératives est également à l'étude.

BIBLIOGRAPHIE

Abelson-Mitchell, N. (2008). Epidemiology and prevention of head injuries: literature review. *J Clin Nurs* 17, 46-57.

Allen (1912). The cessation of mitosis in the central nervous system of albino rat. *J Comp Neurol* 19, 547-568.

Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 137, 433-457.

Altman, J., and Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-335.

Altman, J., and Das, G. D. (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 126, 337-389.

Anand, N., and Stead, L. G. (2005). Neuron-specific enolase as a marker for acute ischemic stroke: a systematic review. *Cerebrovasc Dis* 20, 213-219.

Andrews, P. J., Sinclair, L. H., Harris, B., Baldwin, M. J., Battison, C. G., Rhodes, J. K., Murray, G., and De Backer, D. (2013). Study of therapeutic hypothermia (32 to 35 degrees C) for intracranial pressure reduction after traumatic brain injury (the Eurotherm3235Trial): outcome of the pilot phase of the trial. *Trials* 14, 277.

Arikath, J., and Reichardt, L. F. (2008). Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 31, 487-494.

Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8, 963-970.

Badaut, J., Ashwal, S., and Obenaus, A. (2011). Aquaporins in cerebrovascular disease: a target for treatment of brain edema? *Cerebrovasc Dis* 31, 521-531.

Badaut, J., Ashwal, S., Tone, B., Regli, L., Tian, H. R., and Obenaus, A. (2007). Temporal and regional evolution of aquaporin-4 expression and magnetic resonance imaging in a rat pup model of neonatal stroke. *Pediatr Res* 62, 248-254.

Barzo, P., Marmarou, A., Fatouros, P., Hayasaki, K., and Corwin, F. (1997). Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging. *J Neurosurg* 87, 900-907.

Bavarsad Shahripour, R., Shamsaei, G., Pakdaman, H., Majdinasab, N., Nejad, E. M., Sajedi, S. A., Norouzi, M., Hemmati, A., Manouchehri, R. H., and Shiravi, A. (2011). The effect of NeuroAiD (MLC601) on cerebral blood flow velocity in subjects' post brain infarct in the middle cerebral artery territory. *Eur J Intern Med* 22, 509-513.

Beauquis, J., Roig, P., De Nicola, A. F., and Saravia, F. (2010). Short-term environmental enrichment enhances adult neurogenesis, vascular network and dendritic complexity in the hippocampus of type 1 diabetic mice. *PLoS One* 5, e13993.

Beauquis, J., Roig, P., Homo-Delarche, F., De Nicola, A., and Saravia, F. (2006). Reduced hippocampal neurogenesis and number of hilar neurones in streptozotocin-induced diabetic mice: reversion by antidepressant treatment. *Eur J Neurosci* 23, 1539-1546.

Beghi, E. (2003). Overview of studies to prevent posttraumatic epilepsy. *Epilepsia* 44 Suppl 10, 21-26.

Bendel, O., Bueters, T., von Euler, M., Ove Ogren, S., Sandin, J., and von Euler, G. (2005). Reappearance of hippocampal CA1 neurons after ischemia is associated with recovery of learning and memory. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 1586-1595.

Bernard, S. A., Gray, T. W., Buist, M. D., Jones, B. M., Silvester, W., Gutteridge, G., and Smith, K. (2002). Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 346, 557-563.

Biberthaler, P., Linsenmeier, U., Pfeifer, K. J., Kroetz, M., Mussack, T., Kanz, K. G., Hoecherl, E. F., Jonas, F., Marzi, I., Leucht, P., et al. (2006). Serum S-100B concentration provides additional information for the indication of computed tomography in patients after minor head injury: a prospective multicenter study. *Shock* 25, 446-453.

Boku, S., Nakagawa, S., and Koyama, T. (2010). Glucocorticoids and lithium in adult hippocampal neurogenesis. *Vitam Horm* 82, 421-431.

Bonfanti, L., and Ponti, G. (2008). Adult mammalian neurogenesis and the New Zealand white rabbit. *Vet J* 175, 310-331.

Bradbury, E. J., Moon, L. D., Popat, R. J., King, V. R., Bennett, G. S., Patel, P. N., Fawcett, J. W., and McMahon, S. B. (2002). Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury. *Nature* 416, 636-640.

Bratton, S. L., Chestnut, R. M., Ghajar, J., McConnell Hammond, F. F., Harris, O. A., Hartl, R., Manley, G. T., Nemecek, A., Newell, D. W., Rosenthal, G., et al. (2007a). Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. VIII. Intracranial pressure thresholds. *J Neurotrauma* 24 Suppl 1, S55-58.

Bratton, S. L., Chestnut, R. M., Ghajar, J., McConnell Hammond, F. F., Harris, O. A., Hartl, R., Manley, G. T., Nemecek, A., Newell, D. W., Rosenthal, G., et al. (2007b). Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. XIII. Antiseizure prophylaxis. *J Neurotrauma* 24 Suppl 1, S83-86.

Brott, T., and Bogousslavsky, J. (2000). Treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 343, 710-722.

Bryant, R. A., and Harvey, A. G. (1999). Postconcussive symptoms and posttraumatic stress disorder after mild traumatic brain injury. *J Nerv Ment Dis* 187, 302-305.

Cajal, R. y. (1913). *Degeneration and regeneration of the nervous system*. Oxford Univ Press.

Cameron, H. A., McEwen, B. S., and Gould, E. (1995). Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 15, 4687-4692.

Chen, C., Venketasubramanian, N., Gan, R. N., Lambert, C., Picard, D., Chan, B. P., Chan, E., Bousser, M. G., and Xuemin, S. (2009). Danqi Piantang Jiaonang (DJ), a traditional Chinese medicine, in poststroke recovery. *Stroke* 40, 859-863.

Chen, C. L., Ikram, K., Anqi, Q., Yin, W. T., Chen, A., and Venketasubramanian, N. (2013a). The NeuroAiD II (MLC901) in vascular cognitive impairment study (NEURITES). *Cerebrovasc Dis* 35 Suppl 1, 23-29.

Chen, C. L., Venketasubramanian, N., Lee, C. F., Wong, K. S., and Bousser, M. G. (2013b). Effects of MLC601 on early vascular events in patients after stroke: the CHIMES study. *Stroke* 44, 3580-3583.

Chen, C. L., Young, S. H., Gan, H. H., Singh, R., Lao, A. Y., Baroque, A. C., 2nd, Chang, H. M., Hiyadan, J. H., Chua, C. L., Advincula, J. M., et al. (2013c). Chinese Medicine Neuroaid Efficacy on Stroke Recovery: A Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Study. *Stroke* 44, 2093-2100.

Chen, J., Ye, X., Yan, T., Zhang, C., Yang, X. P., Cui, X., Cui, Y., Zacharek, A., Roberts, C., Liu, X., et al. (2011). Adverse effects of bone marrow stromal cell treatment of stroke in diabetic rats. *Stroke* 42, 3551-3558.

Chen, Y., and Sun, F. Y. (2007). Age-related decrease of striatal neurogenesis is associated with apoptosis of neural precursors and newborn neurons in rat brain after ischemia. *Brain Res* 1166, 9-19.

Chhor, V., Canini, F., De Rudnicki, S., Dahmani, S., Gressens, P., and Constantin, P. (2013). [Hyperbaric oxygen therapy and inert gases in cerebral ischemia and traumatic brain injury]. *Ann Fr Anesth Reanim* 32, 863-871.

Clifton, G. (2000). Hypothermia and severe brain injury. *J Neurosurg* 93, 718-719.

Clifton, G. L., Valadka, A., Zygun, D., Coffey, C. S., Drever, P., Fourwinds, S., Janis, L. S., Wilde, E., Taylor, P., Harshman, K., et al. (2011). Very early hypothermia induction in patients with severe brain injury (the National Acute Brain Injury Study: Hypothermia II): a randomised trial. *Lancet Neurol* 10, 131-139.

Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1), 1-16.

Coles, J. P., Fryer, T. D., Smielewski, P., Rice, K., Clark, J. C., Pickard, J. D., and Menon, D. K. (2004). Defining ischemic burden after traumatic brain injury using 15O PET imaging of cerebral physiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 24, 191-201.

Corwin, H. L., Gettinger, A., Fabian, T. C., May, A., Pearl, R. G., Heard, S., An, R., Bowers, P. J., Burton, P., Klausner, M. A., and Corwin, M. J. (2007). Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients. *N Engl J Med* 357, 965-976.

Cox, C. S., Jr., Baumgartner, J. E., Harting, M. T., Worth, L. L., Walker, P. A., Shah, S. K., Ewing-Cobbs, L., Hasan, K. M., Day, M. C., Lee, D., et al. (2011). Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for severe traumatic brain injury in children. *Neurosurgery* 68, 588-600.

Degos (2013). Bone Fracture exacerbates murine ischemic cerebral injury. *Anesthesiology*.

Dere, E., Huston, J. P., and De Souza Silva, M. A. (2005). Integrated memory for objects, places, and temporal order: evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol Learn Mem* 84, 214-221.

Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M. A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391-397.

Diskin, T., Tal-Or, P., Erlich, S., Mizrachy, L., Alexandrovich, A., Shohami, E., and Pinkas-Kramarski, R. (2005). Closed head injury induces upregulation of Beclin 1 at the cortical site of injury. *J Neurotrauma* 22, 750-762.

Dixon, C. E., Lighthall, J. W., and Anderson, T. E. (1988). Physiologic, histopathologic, and cineradiographic characterization of a new fluid-percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 5, 91-104.

Dixon, C. E., Lyeth, B. G., Povlishock, J. T., Findling, R. L., Hamm, R. J., Marmarou, A., Young, H. F., and Hayes, R. L. (1987). A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg* 67, 110-119.

Dodson, R. F., Chu, L. W., Welch, K. M., and Achar, V. S. (1977). Acute tissue response to cerebral ischemia in the gerbil. An ultrastructural study. *J Neurol Sci* 33, 161-170.

Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (2002). EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36, 1021-1034.

Donato, R. (2003). Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 60, 540-551.

Duan, J., Murohara, T., Ikeda, H., Sasaki, K., Shintani, S., Akita, T., Shimada, T., and Imaizumi, T. (2000). Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2579-2585.

Dubinsky, J. M., Kristal, B. S., and Elizondo-Fournier, M. (1995). An obligate role for oxygen in the early stages of glutamate-induced, delayed neuronal death. *J Neurosci* 15, 7071-7078.

Dumas, F., and Cariou, A. (2014). [Epidemiology, prognostic data of cardiac arrest in 2014]. *Presse Med* 43, 768-774.

Edgren, E., Hedstrand, U., Kelsey, S., Sutton-Tyrrell, K., and Safar, P. (1994). Assessment of neurological prognosis in comatose survivors of cardiac arrest. BRCT I Study Group. *Lancet* 343, 1055-1059.

Ehrenreich, H., Hasselblatt, M., Dembowski, C., Cepek, L., Lewczuk, P., Stiefel, M., Rustenbeck, H. H., Breiter, N., Jacob, S., Knerlich, F., et al. (2002). Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 8, 495-505.

El Sayed, T., Mota, A., Fraternali, F., and Ortiz, M. (2008). A variational constitutive model for soft biological tissues. *J Biomech* 41, 1458-1466.

Emery, D. L., Fulp, C. T., Saatman, K. E., Schutz, C., Neugebauer, E., and McIntosh, T. K. (2005). Newly born granule cells in the dentate gyrus rapidly extend axons into the hippocampal CA3 region following experimental brain injury. *J Neurotrauma* 22, 978-988.

Engberg, A. W., and Teasdale, T. W. (2004). A population-based study of survival and discharge status for survivors after head injury. *Acta Neurol Scand* 110, 281-290.

Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317.

Erlandsson, A., Lin, C. H., Yu, F., and Morshead, C. M. (2011). Immunosuppression promotes endogenous neural stem and progenitor cell migration and tissue regeneration after ischemic injury. *Exp Neurol* 230, 48-57.

Ewy, G. A. (2005). Cardiocerebral resuscitation: the new cardiopulmonary resuscitation. *Circulation* 111, 2134-2142.

Faden, A. I., Demediuk, P., Panter, S. S., and Vink, R. (1989). The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244, 798-800.

Faul, M., Wald, M. M., Rutland-Brown, W., Sullivent, E. E., and Sattin, R. W. (2007). Using a cost-benefit analysis to estimate outcomes of a clinical treatment guideline: testing the Brain Trauma Foundation guidelines for the treatment of severe traumatic brain injury. *J Trauma* 63, 1271-1278.

Ferrara, N., LeCouter, J., Lin, R., and Peale, F. (2004). EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors. *Biochim Biophys Acta* 1654, 69-78.

Franke, T. F., Yang, S. I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R., and Tsichlis, P. N. (1995). The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, 727-736.

Fukuda, A. M., Pop, V., Spagnoli, D., Ashwal, S., Obenaus, A., and Badaut, J. (2012). Delayed increase of astrocytic aquaporin 4 after juvenile traumatic brain injury: possible role in edema resolution? *Neuroscience* 222, 366-378.

Gabbe, B. J., Lyons, R. A., Lecky, F. E., Bouamra, O., Woodford, M., Coats, T. J., and Cameron, P. A. (2011). Comparison of mortality following hospitalisation for isolated head injury in England and Wales, and Victoria, Australia. *PLoS One* 6, e20545.

Gan, R., Lambert, C., Lianting, J., Chan, E. S., Venketasubramanian, N., Chen, C., Chan, B. P., Samama, M. M., and Bousser, M. G. (2008). Danqi Piantan Jiaonang does not modify hemostasis, hematology, and biochemistry in normal subjects and stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 25, 450-456.

Gasche, Y., and Copin, J. C. (2003). [Blood-brain barrier pathophysiology and ischaemic brain oedema]. *Ann Fr Anesth Reanim* 22, 312-319.

Ghandehari (2011). NeuroAid (MLC601) versus piracetam in the recovery of post-infarct homonymous hemianopsia. *Neural reg res* 6, 18-422.

Ginsberg, M. D., Zhao, W., Alonso, O. F., Loores-Estades, J. Y., Dietrich, W. D., and Busto, R. (1997). Uncoupling of local cerebral glucose metabolism and blood flow after acute fluid-percussion injury in rats. *Am J Physiol* 272, H2859-2868.

Gordon, T., Brushart, T. M., Amirjani, N., and Chan, K. M. (2007). The potential of electrical stimulation to promote functional recovery after peripheral nerve injury--comparisons between rats and humans. *Acta Neurochir Suppl* 100, 3-11.

Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8, 481-488.

Graves, J. R., Herlitz, J., Bang, A., Axelsson, A., Ekstrom, L., Holmberg, M., Lindqvist, J., Sunnerhagen, K., and Holmberg, S. (1997). Survivors of out of hospital cardiac arrest: their prognosis, longevity and functional status. *Resuscitation* 35, 117-121.

Greenberg, D. A., and Jin, K. (2005). From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 438, 954-959.

Grefkes, C., Nowak, D. A., Eickhoff, S. B., Dafotakis, M., Kust, J., Karbe, H., and Fink, G. R. (2008). Cortical connectivity after subcortical stroke assessed with functional magnetic resonance imaging. *Ann Neurol* 63, 236-246.

Gu, W., Brannstrom, T., and Wester, P. (2000). Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 1166-1173.

Harandi, A. A., Abolfazli, R., Hatemian, A., Ghraozlee, K., Ghaffar-Pour, M., Karimi, M., Shahbegi, S., Pakdaman, H., Tabasi, M., Tabatabae, A. L., and Nourian, A. (2011). Safety and Efficacy of MLC601 in Iranian Patients after Stroke: A Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Stroke Res Treat* 2011, 721613.

Hartley, T, Lever C., Burgess, N., O'Keefe, J., Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition, *Philos Trans R Soc Lond B Biol*(369)

Hayward, N. M., Immonen, R., Tuunanen, P. I., Ndode-Ekane, X. E., Grohn, O., and Pitkanen, A. (2010). Association of chronic vascular changes with functional outcome after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 27, 2203-2219.

Hayward, N. M., Tuunanen, P. I., Immonen, R., Ndode-Ekane, X. E., Pitkanen, A., and Grohn, O. (2011). Magnetic resonance imaging of regional hemodynamic and cerebrovascular recovery after lateral fluid-percussion brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 166-177.

Hellmich, H. L., Capra, B., Eidson, K., Garcia, J., Kennedy, D., Uchida, T., Parsley, M., Cowart, J., DeWitt, D. S., and Prough, D. S. (2005). Dose-dependent neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Res* 1044, 144-154.

Heurteaux, C., Gandin, C., Borsotto, M., Widmann, C., Brau, F., Lhuillier, M., Onteniente, B., and Lazdunski, M. (2010). Neuroprotective and neuroproliferative activities of NeuroAid (MLC601, MLC901), a Chinese medicine, in vitro and in vivo. *Neuropharmacology* 58, 987-1001.

Heurteaux, C., Lauritzen, I., Widmann, C., and Lazdunski, M. (1995). Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4666-4670.

Heurteaux, C., Widmann, C., Moha Ou Maati, H., Quintard, H., Gandin, C., Borsotto, M., Veyssiere, J., Onteniente, B., and Lazdunski, M. (2013). NeuroAiD: Properties for Neuroprotection and Neurorepair. *Cerebrovasc Dis* 35 Suppl 1, 1-7.

Hicks, R., Soares, H., Smith, D., and McIntosh, T. (1996). Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta Neuropathol* 91, 236-246.

Hirtz, D., Thurman, D. J., Gwinn-Hardy, K., Mohamed, M., Chaudhuri, A. R., and Zalutsky, R. (2007). How common are the "common" neurologic disorders? *Neurology* 68, 326-337.

Humphreys, I., Wood, R. L., Phillips, C. J., and Macey, S. (2013). The costs of traumatic brain injury: a literature review. *Clinicoecon Outcomes Res* 5, 281-287.

Ip, E. Y., Giza, C. C., Griesbach, G. S., and Hovda, D. A. (2002). Effects of enriched environment and fluid percussion injury on dendritic arborization within the cerebral cortex of the developing rat. *J Neurotrauma* 19, 573-585.

Jayakumar, A. R., Panickar, K. S., Murthy Ch, R., and Norenberg, M. D. (2006). Oxidative stress and mitogen-activated protein kinase phosphorylation mediate ammonia-induced cell swelling and glutamate uptake inhibition in cultured astrocytes. *J Neurosci* 26, 4774-4784.

Jayakumar, A. R., Rao, K. V., Panickar, K. S., Moriyama, M., Reddy, P. V., and Norenberg, M. D. (2008). Trauma-induced cell swelling in cultured astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 417-427.

Jayakumar, A. R., Tong, X. Y., Ruiz-Cordero, R., Bregy, A., Bethea, J. R., Bramlett, H. M., and Norenberg, M. D. (2014). Activation of NF-kappaB mediates astrocyte swelling and brain edema in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 31, 1249-1257.

Jhas, S., Ciura, S., Belanger-Jasmin, S., Dong, Z., Llamosas, E., Theriault, F. M., Joachim, K., Tang, Y., Liu, L., Liu, J., and Stifani, S. (2006). Hes6 inhibits astrocyte differentiation and promotes neurogenesis through different mechanisms. *J Neurosci* 26, 11061-11071.

Jiang, W., Gu, W., Brannstrom, T., Rosqvist, R., and Wester, P. (2001). Cortical neurogenesis in adult rats after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 32, 1201-1207.

Jin, K., Wang, X., Xie, L., Mao, X. O., and Greenberg, D. A. (2010). Transgenic ablation of doublecortin-expressing cells suppresses adult neurogenesis and worsens stroke outcome in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7993-7998.

Jin, X., Bookstein, R., Wills, K., Avanzini, J., Tsai, V., LaFace, D., Terracina, G., Shi, B., and Nielsen, L. L. (2001). Evaluation of endostatin antiangiogenesis gene therapy in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 8, 982-989.

Keane, R. W., Kraydieh, S., Lotocki, G., Alonso, O. F., Aldana, P., and Dietrich, W. D. (2001). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 1189-1198.

Kempermann, G. (2002). Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. *Bipolar Disord* 4, 17-33.

Kerever, A., Schnack, J., Vellinga, D., Ichikawa, N., Moon, C., Arikawa-Hirasawa, E., Efir, J. T., and Mercier, F. (2007). Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem Cells* 25, 2146-2157.

Kilic, E., ElAli, A., Kilic, U., Guo, Z., Ugur, M., Uslu, U., Bassetti, C. L., Schwab, M. E., and Hermann, D. M. (2010). Role of Nogo-A in neuronal survival in the reperfused ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 969-984.

Kim, F., Nichol, G., Maynard, C., Hallstrom, A., Kudenchuk, P. J., Rea, T., Copass, M. K., Carlbom, D., Deem, S., Longstreth, W. T., Jr., et al. (2014). Effect of prehospital induction of mild hypothermia on survival and neurological status among adults with cardiac arrest: a randomized clinical trial. *Jama* 311, 45-52.

Klatzo, I. (1967). Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 26, 1-14.

Kobilo, T., Liu, Q. R., Gandhi, K., Mughal, M., Shaham, Y., and van Praag, H. (2011). Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. *Learn Mem* 18, 605-609.

Kong, K. H., Wee, S. K., Ng, C. Y., Chua, K., Chan, K. F., Venketasubramanian, N., and Chen, C. (2009). A double-blind, placebo-controlled, randomized phase II pilot study to investigate the potential efficacy of the traditional chinese medicine Neuroaid (MLC 601) in enhancing recovery after stroke (TIERS). *Cerebrovasc Dis* 28, 514-521.

Koren, D., Arnon, I., and Klein, E. (1999). Acute stress response and posttraumatic stress disorder in traffic accident victims: a one-year prospective, follow-up study. *Am J Psychiatry* 156, 367-373.

Kristian, T., Ouyang, Y., and Siesjo, B. K. (1996). Calcium-induced neuronal cell death in vivo and in vitro: are the pathophysiologic mechanisms different? *Adv Neurol* 71, 107-113; discussion 113-108.

Lambert, T. J., Fernandez, S. M., and Frick, K. M. (2005). Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiol Learn Mem* 83, 206-216.

Laurent, I., Monchi, M., Chiche, J. D., Joly, L. M., Spaulding, C., Bourgeois, B., Cariou, A., Rozenberg, A., Carli, P., Weber, S., and Dhainaut, J. F. (2002). Reversible myocardial dysfunction in survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *J Am Coll Cardiol* 40, 2110-2116.

Lee, C., and Agoston, D. V. (2010). Vascular endothelial growth factor is involved in mediating increased de novo hippocampal neurogenesis in response to traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 27, 541-553.

Lee, H. K., Barbarosie, M., Kameyama, K., Bear, M. F., and Huganir, R. L. (2000a). Regulation of distinct AMPA receptor phosphorylation sites during bidirectional synaptic plasticity. *Nature* 405, 955-959.

Lee, J. K., Kim, J. E., Sivula, M., and Strittmatter, S. M. (2004). Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity. *J Neurosci* 24, 6209-6217.

Lee, J. M., Grabb, M. C., Zipfel, G. J., and Choi, D. W. (2000b). Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest* 106, 723-731.

- Leventhal, C., Rafii, S., Rafii, D., Shahar, A., and Goldman, S. A. (1999). Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol Cell Neurosci* 13, 450-464.
- Li, S., Overman, J. J., Katsman, D., Kozlov, S. V., Donnelly, C. J., Twiss, J. L., Giger, R. J., Coppola, G., Geschwind, D. H., and Carmichael, S. T. (2010). An age-related sprouting transcriptome provides molecular control of axonal sprouting after stroke. *Nat Neurosci* 13, 1496-1504.
- Li, Y., Lu, Z. Y., Ogle, M., and Wei, L. (2007). Erythropoietin prevents blood brain barrier damage induced by focal cerebral ischemia in mice. *Neurochem Res* 32, 2132-2141.
- Liang, H. W., Qiu, S. F., Shen, J., Sun, L. N., Wang, J. Y., Bruce, I. C., and Xia, Q. (2008). Genistein attenuates oxidative stress and neuronal damage following transient global cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 438, 116-120.
- Lim, D. A., Tramontin, A. D., Trevejo, J. M., Herrera, D. G., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28, 713-726.
- Lim, Y. A., Murray, L. A., Lai, M. K., and Chen, C. (2013). NeuroAiD(R) (MLC601) and amyloid precursor protein processing. *Cerebrovasc Dis* 35 Suppl 1, 30-37.
- Lipton, M. L., Gellella, E., Lo, C., Gold, T., Ardekani, B. A., Shifteh, K., Bello, J. A., and Branch, C. A. (2008). Multifocal white matter ultrastructural abnormalities in mild traumatic brain injury with cognitive disability: a voxel-wise analysis of diffusion tensor imaging. *J Neurotrauma* 25, 1335-1342.
- Lipton, S. A., and Rosenberg, P. A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med* 330, 613-622.
- Liu, L., and Yenari, M. A. (2007). Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. *Front Biosci* 12, 816-825.

Liu, Z., Li, Y., Zhang, X., Savant-Bhonsale, S., and Chopp, M. (2008). Contralateral axonal remodeling of the corticospinal system in adult rats after stroke and bone marrow stromal cell treatment. *Stroke* 39, 2571-2577.

Loane DJ, Byrnes KR (2010) Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* (7): 366-377.

Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148.

Lowenstein, D. H. (2009). Epilepsy after head injury: an overview. *Epilepsia* 50 Suppl 2, 4-9.

Lu, D., Goussev, A., Chen, J., Pannu, P., Li, Y., Mahmood, A., and Chopp, M. (2004). Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 21, 21-32.

Lu, D., Li, Y., Wang, L., Chen, J., Mahmood, A., and Chopp, M. (2001). Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 18, 813-819.

Lu, K. T., Wu, C. Y., Yen, H. H., Peng, J. H., Wang, C. L., and Yang, Y. L. (2007). Bumetanide administration attenuated traumatic brain injury through IL-1 overexpression. *Neurol Res* 29, 404-409.

Lundgren-Nilsson, A., Rosen, H., Hofgren, C., and Sunnerhagen, K. S. (2005). The first year after successful cardiac resuscitation: function, activity, participation and quality of life. *Resuscitation* 66, 285-289.

Maas, A. I., Stocchetti, N., and Bullock, R. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* 7, 728-741.

MacManus, J. P., Buchan, A. M., Hill, I. E., Rasquinha, I., and Preston, E. (1993). Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain. *Neurosci Lett* 164, 89-92.

Magavi, S. S., Leavitt, B. R., and Macklis, J. D. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405, 951-955.

Mahmood, A., Lu, D., Wang, L., and Chopp, M. (2002). Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 19, 1609-1617.

Mahmood, A., Lu, D., Yi, L., Chen, J. L., and Chopp, M. (2001). Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats. *J Neurosurg* 94, 589-595.

Manley, G. T., Fujimura, M., Ma, T., Noshita, N., Filiz, F., Bollen, A. W., Chan, P., and Verkman, A. S. (2000). Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med* 6, 159-163.

Marion, D. W., Penrod, L. E., Kelsey, S. F., Obrist, W. D., Kochanek, P. M., Palmer, A. M., Wisniewski, S. R., and DeKosky, S. T. (1997). Treatment of traumatic brain injury with moderate hypothermia. *N Engl J Med* 336, 540-546.

Marmarou, A., Signoretti, S., Fatouros, P. P., Portella, G., Aygok, G. A., and Bullock, M. R. (2006). Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. *J Neurosurg* 104, 720-730.

Masuda, S., Nagao, M., Takahata, K., Konishi, Y., Gallyas, F., Jr., Tabira, T., and Sasaki, R. (1993). Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem* 268, 11208-11216.

Mattson, M. P., and Mark, R. J. (1996). Excitotoxicity and excitoprotection in vitro. *Adv Neurol* 71, 1-30; discussion 30-35.

Mercier, E., Boutin, A., Lauzier, F., Fergusson, D. A., Simard, J. F., Zarychanski, R., Moore, L., McIntyre, L. A., Archambault, P., Lamontagne, F., et al. (2013). Predictive value of S-100beta protein for prognosis in patients with moderate and severe traumatic brain injury: systematic review and meta-analysis. *Bmj* 346, f1757.

Migaud, M., Batailler, M., Segura, S., Duittoz, A., Franceschini, I., and Pillon, D. (2010). Emerging new sites for adult neurogenesis in the mammalian brain: a comparative study between the hypothalamus and the classical neurogenic zones. *Eur J Neurosci* 32, 2042-2052.

Moha Ou Maati, H., Borsotto, M., Chatelain, F., Widmann, C., Lazdunski, M., and Heurteaux, C. (2012). Activation of ATP-sensitive potassium channels as an element of the neuroprotective effects of the Traditional Chinese Medicine MLC901 against oxygen glucose deprivation. *Neuropharmacology* 63, 692-700.

Moon, L. D., Asher, R. A., Rhodes, K. E., and Fawcett, J. W. (2001). Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nat Neurosci* 4, 465-466.

Moore, E. L., Terryberry-Spohr, L., and Hope, D. A. (2006). Mild traumatic brain injury and anxiety sequelae: a review of the literature. *Brain Inj* 20, 117-132.

Moro, N., and Sutton, R. L. (2010). Beneficial effects of sodium or ethyl pyruvate after traumatic brain injury in the rat. *Exp Neurol* 225, 391-401.

Nakatomi, H., Kuriu, T., Okabe, S., Yamamoto, S., Hatano, O., Kawahara, N., Tamura, A., Kirino, T., and Nakafuku, M. (2002). Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110, 429-441.

Namas, R., Ghuma, A., Hermus, L., Zamora, R., Okonkwo, D. O., Billiar, T. R., and Vodovotz, Y. (2009). The acute inflammatory response in trauma / hemorrhage and traumatic brain injury: current state and emerging prospects. *Libyan J Med* 4, 97-103.

Nash, D. L., Bellolio, M. F., and Stead, L. G. (2008). S100 as a marker of acute brain ischemia: a systematic review. *Neurocrit Care* 8, 301-307.

Navarro, J. C., Chen, C. L., Lagamayo, P. D., Geslani, M. B., Eow, G. B., Pongvarin, N., de Silva, A., Wong, L. K., and Venketasubramanian, N. (2013). CHIMES-I: sub-group analyzes of the effects of NeuroAiD according to baseline brain imaging characteristics among patients randomized in the CHIMES study. *Int J Stroke* 8, 491-494.

Nguemeni, C., Delplanque, B., Rovere, C., Simon-Rousseau, N., Gandin, C., Agnani, G., Nahon, J. L., Heurteaux, C., and Blondeau, N. (2010). Dietary supplementation of alpha-linolenic acid in an enriched rapeseed oil diet protects from stroke. *Pharmacol Res* 61, 226-233.

Nicoletti, F., Bruno, V., Copani, A., Casabona, G., and Knopfel, T. (1996). Metabotropic glutamate receptors: a new target for the therapy of neurodegenerative disorders? *Trends Neurosci* 19, 267-271.

Nolan, J. P., Morley, P. T., Vanden Hoek, T. L., Hickey, R. W., Kloeck, W. G., Billi, J., Bottiger, B. W., Morley, P. T., Nolan, J. P., Okada, K., et al. (2003). Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: an advisory statement by the advanced life support task force of the International Liaison Committee on Resuscitation. *Circulation* 108, 118-121.

O'Reilly, S. M., Grubb, N., and O'Carroll, R. E. (2004). Long-term emotional consequences of in-hospital cardiac arrest and myocardial infarction. *Br J Clin Psychol* 43, 83-95.

Onteniente, B (2013). The multiple aspects of stroke and stem cell therapy. *Curr Mol Med* 13(5), 821-831.

Ostrowski, S. M., Wilkinson, B. L., Golde, T. E., and Landreth, G. (2007). Statins reduce amyloid-beta production through inhibition of protein isoprenylation. *J Biol Chem* 282, 26832-26844.

Patel, T. P., Ventre, S. C., and Meaney, D. F. (2012). Dynamic changes in neural circuit topology following mild mechanical injury in vitro. *Ann Biomed Eng* 40, 23-36.

Patil, S., Bhayani, S., Denton, J. M., and Nolan, J. (2011). Therapeutic hypothermia for out-of-hospital cardiac arrest: implementation in a district general hospital emergency department. *Emerg Med J* 28, 970-973.

Pfeifer, R., Borner, A., Krack, A., Sigusch, H. H., Surber, R., and Figulla, H. R. (2005). Outcome after cardiac arrest: predictive values and limitations of the neuroproteins neuron-specific enolase and protein S-100 and the Glasgow Coma Scale. *Resuscitation* 65, 49-55.

Pleines, U. E., Morganti-Kossmann, M. C., Rancan, M., Joller, H., Trentz, O., and Kossmann, T. (2001). S-100 beta reflects the extent of injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 18, 491-498.

Povlishock, J. T., and Christman, C. W. (1995). The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts. *J Neurotrauma* 12, 555-564.

Pulsinelli, W. A., and Brierley, J. B. (1979). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10, 267-272.

Qian, L., Nagaoka, T., Ohno, K., Tominaga, B., Nariai, T., Hirakawa, K., Kuroiwa, T., Takakuda, K., and Miyairi, H. (1996a). Magnetic resonance imaging and pathologic studies on lateral fluid percussion injury as a model of focal brain injury in rats. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 43, 53-66.

Qian, L., Ohno, K., Maehara, T., Tominaga, B., Hirakawa, K., Kuroiwa, T., Takakuda, K., and Miyairi, H. (1996b). Changes in ICBF, morphology and related parameters by fluid percussion injury. *Acta Neurochir (Wien)* 138, 90-98.

Quintard, H., Borsotto, M., Veyssiere, J., Gandin, C., Labbal, F., Widmann, C., Lazdunski, M., and Heurteaux, C. (2011). MLC901, a traditional Chinese medicine protects the brain against global ischemia. *Neuropharmacology* 61, 622-631.

Raghupathi, R. (2004). Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol* 14, 215-222.

Raghupathi, R., Graham, D. I., and McIntosh, T. K. (2000). Apoptosis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 17, 927-938.

Rajasekaran, K., Seth, R., Abelson, A., and Batra, P. S. Prevalence of metabolic bone disease among chronic rhinosinusitis patients treated with oral glucocorticoids. *Am J Rhinol Allergy* 24, 215-219.

Rao, K. V., Reddy, P. V., Curtis, K. M., and Norenberg, M. D. (2011). Aquaporin-4 expression in cultured astrocytes after fluid percussion injury. *J Neurotrauma* 28, 371-381.

Rash, J. E., Yasumura, T., Hudson, C. S., Agre, P., and Nielsen, S. (1998). Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11981-11986.

Reagan-Shaw, S., Nihal, M., and Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. *Faseb J* 22, 659-661.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.

Roine, R. O., Kajaste, S., and Kaste, M. (1993). Neuropsychological sequelae of cardiac arrest. *Jama* 269, 237-242.

Roof, R. L., Hoffman, S. W., and Stein, D. G. (1997). Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol Chem Neuropathol* 31, 1-11.

Rosen, H., Sunnerhagen, K. S., Herlitz, J., Blomstrand, C., and Rosengren, L. (2001). Serum levels of the brain-derived proteins S-100 and NSE predict long-term outcome after cardiac arrest. *Resuscitation* 49, 183-191.

Ruscher, K., Johannesson, E., Brugiére, E., Erickson, A., Rickhag, M., and Wieloch, T. (2009). Enriched environment reduces apolipoprotein E (ApoE) in reactive astrocytes and attenuates inflammation of the peri-infarct tissue after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 1796-1805.

Russel (2011). Sensorimotor behavioral tests for use in a juvenil rat model of traumatic brain injury: Assessment of sex differences. *Journal of Neuroscience Methods* 199, 214-222.

Salmond, C. H., and Sahakian, B. J. (2005). Cognitive outcome in traumatic brain injury survivors. *Curr Opin Crit Care* 11, 111-116.

Sanders, M. J., Dietrich, W. D., and Green, E. J. (1999). Cognitive function following traumatic brain injury: effects of injury severity and recovery period in a parasagittal fluid-percussive injury model. *J Neurotrauma* 16, 915-925.

Santamaria-Kisiel, L., Rintala-Dempsey, A. C., and Shaw, G. S. (2006). Calcium-dependent and - independent interactions of the S100 protein family. *Biochem J* 396, 201-214.

Sashindranath, M., Sales, E., Daglas, M., Freeman, R., Samson, A. L., Cops, E. J., Beckham, S., Galle, A., McLean, C., Morganti-Kossmann, C., et al. (2012). The tissue-type plasminogen activator-plasminogen activator inhibitor 1 complex promotes neurovascular injury in brain trauma: evidence from mice and humans. *Brain* 135, 3251-3264.

Sauve, M. J. (1995). Long-term physical functioning and psychosocial adjustment in survivors of sudden cardiac death. *Heart Lung* 24, 133-144.

Scheff, S. W., Price, D. A., Hicks, R. R., Baldwin, S. A., Robinson, S., and Brackney, C. (2005). Synaptogenesis in the hippocampal CA1 field following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 22, 719-732.

Schinder, A. F., and Gage, F. H. (2004). A hypothesis about the role of adult neurogenesis in hippocampal function. *Physiology (Bethesda)* 19, 253-261.

Schmued, L. C., Albertson, C., and Slikker, W., Jr. (1997). Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res* 751, 37-46.

Schoepp, D. D., and Conn, P. J. (1993). Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol Sci* 14, 13-20.

Seymour, A. B., Andrews, E. M., Tsai, S. Y., Markus, T. M., Bollnow, M. R., Brenneman, M. M., O'Brien, T. E., Castro, A. J., Schwab, M. E., and Kartje, G. L. (2005). Delayed treatment with monoclonal antibody IN-1 1 week after stroke results in recovery of function and corticorubral plasticity in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 1366-1375.

Shen, J., Xie, L., Mao, X., Zhou, Y., Zhan, R., Greenberg, D. A., and Jin, K. (2008). Neurogenesis after primary intracerebral hemorrhage in adult human brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1460-1468.

Shen, Q., Goderie, S. K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., and Temple, S. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304, 1338-1340.

Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., and Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372-376.

Si, Y. C., Zhang, J. P., Xie, C. E., Zhang, L. J., and Jiang, X. N. (2011). Effects of Panax notoginseng saponins on proliferation and differentiation of rat hippocampal neural stem cells. *Am J Chin Med* 39, 999-1013.

Siddiqui, F. J., Venketasubramanian, N., Chan, E. S., and Chen, C. (2013). Efficacy and safety of MLC601 (NeuroAiD(R)), a traditional Chinese medicine, in poststroke recovery: a systematic review. *Cerebrovasc Dis* 35 Suppl 1, 8-17.

Sinclair, H. L., and Andrews, P. J. (2010). Bench-to-bedside review: Hypothermia in traumatic brain injury. *Crit Care* 14, 204.

Smith, C. M., Chen, Y., Sullivan, M. L., Kochanek, P. M., and Clark, R. S. (2011). Autophagy in acute brain injury: feast, famine, or folly? *Neurobiol Dis* 43, 52-59.

Smith, S. S. (1991). Progesterone administration attenuates excitatory amino acid responses of cerebellar Purkinje cells. *Neuroscience* 42, 309-320.

Sommer, J. B., Norup, A., Poulsen, I., and Morgensen, J. (2013). Cognitive activity limitations one year post-trauma in patients admitted to sub-acute rehabilitation after severe traumatic brain injury. *J Rehabil Med* 45, 778-784.

Sterns, R. H., and Silver, S. M. (2006). Brain volume regulation in response to hypo-osmolality and its correction. *Am J Med* 119, S12-16.

Su, G., Kintner, D. B., Flagella, M., Shull, G. E., and Sun, D. (2002). Astrocytes from Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter-null mice exhibit absence of swelling and decrease in EAA release. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C1147-1160.

Sullivan, P. G., Thompson, M. B., and Scheff, S. W. (1999). Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury. *Exp Neurol* 160, 226-234.

Sun, D., McGinn, M. J., Zhou, Z., Harvey, H. B., Bullock, M. R., and Colello, R. J. (2007). Anatomical integration of newly generated dentate granule neurons following traumatic brain injury in adult rats and its association to cognitive recovery. *Exp Neurol* 204, 264-272.

Szabo, I., and Zoratti, M. (1991). The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J Biol Chem* 266, 3376-3379.

Tanaka, R., Yamashiro, K., Mochizuki, H., Cho, N., Onodera, M., Mizuno, Y., and Urabe, T. (2004). Neurogenesis after transient global ischemia in the adult hippocampus visualized by improved retroviral vector. *Stroke* 35, 1454-1459.

Tapia-Perez, J., Sanchez-Aguilar, M., Torres-Corzo, J. G., Gordillo-Moscoso, A., Martinez-Perez, P., Madeville, P., de la Cruz-Mendoza, E., and Chalita-Williams, J. (2008). Effect of rosuvastatin on amnesia and disorientation after traumatic brain injury (NCT003229758). *J Neurotrauma* 25, 1011-1017.

Thurman, D., and Guerrero, J. (1999). Trends in hospitalization associated with traumatic brain injury. *Jama* 282, 954-957.

Tobin, M. K., Bonds, J. A., Minshall, R. D., Pelligrino, D. A., Testai, F. D., and Lazarov, O. (2014). Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here. *J Cereb Blood Flow Metab*.

Travail, M. d. l. e. e. d., santé, S. à. l., and sociale, M. d. l. s. e. d. l. c. (2012). Programme d'actions 2012 en faveur des traumatisés crâniens et des blessés médullaires.

Tsai M., Chang C., Peng S., Jhuang K., Fang Y., Lin M., Tsao T (2014) Therapeutic efficacy of Neuro Aid(MLC601), a traditional Chinese medicine, in experimental traumatic brain injury. *J Neuroimmune Pharmacol*

Tsukaguchi, H., Weremowicz, S., Morton, C. C., and Hediger, M. A. (1999). Functional and molecular characterization of the human neutral solute channel aquaporin-9. *Am J Physiol* 277, F685-696.

Ueki, T., Tanaka, M., Yamashita, K., Mikawa, S., Qiu, Z., Maragakis, N. J., Hevner, R. F., Miura, N., Sugimura, H., and Sato, K. (2003). A novel secretory factor, Neurogenesis-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci* 23, 11732-11740.

Uden, J., Astrand, R., Waterloo, K., Ingebrigtsen, T., Bellner, J., Reinstrup, P., Andsberg, G., and Romner, B. (2007). Clinical significance of serum S100B levels in neurointensive care. *Neurocrit Care* 6, 94-99.

van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., and Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.

Velly, L., Pellegrini, L., Guillet, B., Bruder, N., and Pisano, P. (2010). Erythropoietin 2nd cerebral protection after acute injuries: a double-edged sword? *Pharmacol Ther* 128, 445-459.

Venero, J. L., Vizuete, M. L., Machado, A., and Cano, J. (2001). Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 63, 321-336.

Venketasubramanian, N., Chen, C. L., Gan, R. N., Chan, B. P., Chang, H. M., Tan, S. B., Picard, D., Navarro, J. C., Baroque, A. C., 2nd, Pongvarin, N., et al. (2009). A double-blind, placebo-controlled, randomized, multicenter study to investigate CHInese Medicine Neuroaid Efficacy on Stroke recovery (CHIMES Study). *Int J Stroke* 4, 54-60.

Venketasubramanian, N., Young, S., Tay, S. S., Chang, H. M., Umapathi, T., Chan, B., de Silva, A., Wong, L., Navarro, J., Zhao, Y. D., et al. (2013). Chinese medicine NeuroAiD efficacy stroke recovery-extension study (CHIMES-E study): an observational multicenter study to investigate the longer-term efficacy of NeuroAiD in stroke recovery. *Cerebrovasc Dis* 35 Suppl 1, 18-22.

Vink, R., Mullins, P. G., Temple, M. D., Bao, W., and Faden, A. I. (2001). Small shifts in craniotomy position in the lateral fluid percussion injury model are associated with differential lesion development. *J Neurotrauma* 18, 839-847.

Vos, P. E., Lamers, K. J., Hendriks, J. C., van Haaren, M., Beems, T., Zimmerman, C., van Geel, W., de Reus, H., Biert, J., and Verbeek, M. M. (2004). Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *Neurology* 62, 1303-1310.

Wang, H., Lynch, J. R., Song, P., Yang, H. J., Yates, R. B., Mace, B., Warner, D. S., Guyton, J. R., and Laskowitz, D. T. (2007). Simvastatin and atorvastatin improve behavioral outcome, reduce hippocampal degeneration, and improve cerebral blood flow after experimental traumatic brain injury. *Exp Neurol* 206, 59-69.

Wang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Zhang, R., and Chopp, M. (2004). Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 35, 1732-1737.

Wang, S., Kee, N., Preston, E., and Wojtowicz, J. M. (2005). Electrophysiological correlates of neural plasticity compensating for ischemia-induced damage in the hippocampus. *Exp Brain Res* 165, 250-260.

Williams, D. S., Detre, J. A., Leigh, J. S., and Koretsky, A. P. (1992). Magnetic resonance imaging of perfusion using spin inversion of arterial water. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 212-216.

Wright, D. W., Kellermann, A. L., Hertzberg, V. S., Clark, P. L., Frankel, M., Goldstein, F. C., Salomone, J. P., Dent, L. L., Harris, O. A., Ander, D. S., et al. (2007). ProTECT: a randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury. *Ann Emerg Med* 49, 391-402, 402 e391-392.

Xiao, G., Wei, J., Yan, W., Wang, W., and Lu, Z. (2008). Improved outcomes from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial. *Crit Care* 12, R61.

Xiao, X., Liu, Y., Qi, C., Qiu, F., Chen, X., Zhang, J., and Yang, P. (2010). Neuroprotection and enhanced neurogenesis by tetramethylpyrazine in adult rat brain after focal ischemia. *Neurol Res* 32, 547-555.

Xiong, Y., Mahmood, A., and Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci* 14, 128-142.

Xiong, Y., Mahmood, A., Meng, Y., Zhang, Y., Zhang, Z. G., Morris, D. C., and Chopp, M. (2011). Treatment of traumatic brain injury with thymosin beta in rats. *J Neurosurg* 114, 102-115.

Xu, J. X., Yang, M., Deng, K. J., and Zhou, H. (2011). Antioxidant activities of *Dracocephalum tanguticum* maxim extract and its up-regulation on the expression of neurotrophic factors in a rat model of permanent focal cerebral ischemia. *Am J Chin Med* 39, 65-81.

Yang, B., Zador, Z., and Verkman, A. S. (2008). Glial cell aquaporin-4 overexpression in transgenic mice accelerates cytotoxic brain swelling. *J Biol Chem* 283, 15280-15286.

Yano, S., Morioka, M., Fukunaga, K., Kawano, T., Hara, T., Kai, Y., Hamada, J., Miyamoto, E., and Ushio, Y. (2001). Activation of Akt/protein kinase B contributes to induction of ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 351-360.

Yao, X. L., Liu, J., Lee, E., Ling, G. S., and McCabe, J. T. (2005). Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 22, 656-668.

Zhang, R., Zhang, L., Zhang, Z., Wang, Y., Lu, M., Lapointe, M., and Chopp, M. (2001). A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. *Ann Neurol* 50, 602-611.

Zhang, Z. X., Guan, L. X., Zhang, K., Zhang, Q., and Dai, L. J. (2008). A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury. *Cytotherapy* 10, 134-139.

Zheng, G. Q., Cheng, W., Wang, Y., Wang, X. M., Zhao, S. Z., Zhou, Y., Liu, S. J., and Wang, X. T. (2011). Ginseng total saponins enhance neurogenesis after focal cerebral ischemia. *J Ethnopharmacol* 133, 724-728.