HAL
open science

L'Acide Alpha-Linolénique, précurseur végétal des oméga-3 pour lutter contre les dommages liés à l'accident vasculaire cérébral

Miled Bourourou

▶ **To cite this version:**

Miled Bourourou. L'Acide Alpha-Linolénique, précurseur végétal des oméga-3 pour lutter contre les dommages liés à l'accident vasculaire cérébral. Sciences agricoles. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2016. Français. NNT : 2016AZUR4067 . tel-01440509

HAL Id: tel-01440509

https://theses.hal.science/tel-01440509v1

Submitted on 19 Jan 2017

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-UFR Sciences
Ecole Doctorale de Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Présentée pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences de la Vie
de l'Université de Nice-Sophia Antipolis
Spécialité : Intéractions Moléculaires et Cellulaires

Par

Miled BOUROUROU

L'Acide Alpha-Linolénique, précurseur végétal des oméga-3 pour lutter contre les dommages liés à l'accident vasculaire cérébral

Thèse dirigée par le Dr. Nicolas BLONDEAU

Soutenue le 21 septembre 2016,

devant le jury

Pr. Laurent COUNILLON, P.U., Nice	Président
Dr. Myriam BERNAUDIN, DR CNRS, Caen	Rapporteur
Pr. Michel GUICHARDANT, P.U., INSA Lyon	Rapporteur
Dr. Nicolas BLONDEAU, C.R., CNRS, NICE	Directeur de Thèse

« Le sage est celui qui maitrise les motivations de son action. »

Lucrèce

Remerciements

La première personne que je tiens à remercier est mon directeur de thèse, **Nicolas**, qui a eu la chance de me supporter durant ces quatre années. Nicolas, merci de m'avoir fait confiance, guidé, encouragé, conseillé, et fait beaucoup voyager pendant ces quatre années tout en me laissant une grande liberté. À mon sens, le métier de chercheur, est de découvrir et d'apporter un savoir scientifique qui soit utile à la société. Du moins, c'est la vision de la recherche que j'ai trouvée en vous, et c'est l'une des principales raisons pour laquelle, j'ai voulu effectuer mon doctorat au sein de ce laboratoire. J'espère avoir été à la hauteur. Si, partager le bureau avec vous durant ma thèse m'a fait grandir scientifiquement, je pense également avoir grandi sur le plan personnel, bon pas encore assez je vous l'accorde mais c'est déjà ça. Je vais reprendre votre poème de Machado, qui aujourd'hui prend tout son sens : « *Le chemin se fait en marchant / Et quand tu regardes en arrière / Tu vois le sentier que jamais / Tu ne dois à nouveau fouler* », je suis fier et heureux du chemin que nous avons parcouru ensemble. Sincèrement, merci pour cette aventure plus que scientifique.

Je tiens à remercier tous les membres du jury et notamment le Dr. **Myriam Bernaudin** et, le Pr. **Michel Guichardant** qui m'ont fait l'honneur d'évaluer mon manuscrit, tout en me permettant de l'améliorer. Je remercie également le Pr. **Laurent Counillon**, d'avoir accepté d'être mon président de jury, et de m'avoir fait confiance tout au long de mon doctorat pour diriger les TDs et participer à la rédaction de l'épreuve de son U.E.

Je remercie le Dr. **Catherine Heurteaux** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, j'y ai passé de très bons moments tant au niveau professionnel que relationnel. Merci également de participer à mon jury de thèse.

Je remercie également l'ensemble des membres de l'équipe, **Cathy** pour tes conseils, qu'aurais-je fais sans toi ! **Carine** pour ta bonne humeur, ton humour, ta plante et tes petits gâteaux à la carotte. J'ai gardé ton portrait, un jour il vaudra de l'or ;). Un merci évidemment aux « *filles d'à côté* », **Agnès**, **Alice**, **Joëlle** et **Thomas** (pour la queue de cheval), mais aussi à **Marc**, **Alaeddine** et **Marielle**. Merci également à, **Elsa**, pour m'avoir appris toute la partie *in vitro* de ma thèse et avec qui je partage une certaine passion pour un club marseillais.

Je tiens également à remercier **Carole Rovère** pour m'avoir permis de collaborer avec son équipe, et bien entendu à tous nos moments passés ensemble que ce soit à l'animalerie,

les vendredis après-midis philosophiques ou encore au hammam ! Merci d'avoir apporté de la bonne humeur tout au long de ma thèse !

Merci également à **Julie** d'avoir toujours été dispo pour les tris ! Et **Fred** pour toutes tes macros et ton aide sur les différents microscopes !

Un grand Merci à mes compagnons de galères. On va commencer avec ceux qui partagent mon labo ! **Payam**, combien de fous rire avons-nous partagé, 10, 15, 25 !!!! Je te remercie pour tous nos délires (touroutah), et tous les moments passés ensemble que ce soit à l'institut, en dehors ou lorsqu'on hushus !!!Avec qui vais-je prendre le cafendo maintenant ? Sinougez vous quand je vais partir !!! **Sarah**, les premières choses qui me viennent à l'esprit sont ton talent pour la peinture de voitures, et le plumeau ! Et rien que pour ça, ça mérite un grand Merci !!! On a bien rigolé surtout avec le reste de la team balls, **Mél**, **Oliv** et **Pierre**, GEEEEEEET !!!

Et puis il y a ceux avec qui tout a commencé, on s'est connu sur les bancs de la fac, **Thomas**, **Ophélia** et **Anissa**, ça a donné les 4 fantastiques (dont un jouait également le rôle du méchant). **Cacaihno**, toujours à râler ! Mais c'est pour ça qu'on t'aime ! Je repense à nos heures passées à la B.U ensemble, on en a fait du chemin depuis ! **Ophélia**, je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi... **Bi****, tu dois être la personne qui a dû m'entendre le plus râler ! Merci d'avoir su m'écouter et certaines fois me guider ! Bon c'était pas triste non plus, hein ! Bien que nous n'avons pas fait notre thèse dans le même institut, on a pu passer de très nombreuses et très bonnes soirées ensemble avec **Barbarhum**, on la remercie de nous avoir épargnés, pour l'instant...

Je remercie également tous les membres de l'équipe de foot « IPMC » et particulièrement **Carmelo** pour ses petits ponts ;). C'était vraiment cool de jouer avec vous, que ce soit dans la victoire (je n'oublierais pas notre match pour la montée) ou dans la défaite !

Enfin un grand merci aux personnes de l'ombre qui ont fait la personne que je suis aujourd'hui, toute ma famille et en particulier à mes parents qui ont toujours cru en moi même dans l'échec. Je pense sincèrement être chanceux d'avoir une famille comme la nôtre. Merci de m'avoir permis de réaliser ce que j'ai toujours voulu. Si je suis ici aujourd'hui c'est en grande partie grâce à vous. Je ne vous le dis jamais, mais je vous aime.... Donc un énorme et des plus sincère MERCI à **M'ma**, **P'pa**, **Latifa**, **Haïckel** et au petit dernier **Younes** (plus connu sous le nom de Francis).

Abstract

Few neurological conditions are as complex and devastating as stroke. Preclinical studies have identified over 1000 neuroprotective molecules for ischemic stroke, leading to more than 200 clinical trials, to date almost all failed. To improve clinical outcome, an emerging direction may be nutritional intervention with omega-3 polyunsaturated fatty acids. Our team demonstrated that α-linolenic acid (ALA), the plant-derived omega-3, administrated by injections or oral supplementation reduces stroke damage by direct neuroprotection, and triggers brain artery vasodilatation and neuroplasticity. Successful translation of therapies depends on demonstration of robust efficacy on functional deficits post-stroke. Therefore, the first aspect of my PhD was to study the potential of the ALA as nutraceutical against stroke.

My work aimed evaluating the value of ALA on post-stroke consequences by comparing whether oral or intravenous (*i.v*) supplementation of ALA best support functional recovery from 30 minutes of middle cerebral artery occlusion (MCAo), a murine model of stroke allowing investigation of long-term functional outcome. While both types of ALA supplementation improved spatial learning and memory after stroke, oral was better than *i.v* treatment in improving motor function. Interestingly, the reduction of the hippocampic damage correlated with cognitive improvement, whereas no dissimilarities were found in the caudate-putamen lesion that could have explained the improved motor recovery by the oral supplementation. In contrast, while the MCAo induced a similar weight loss in all groups the first post-operative day, its recovery was only improved by oral supplementation within the first week post-stroke coinciding with the improved recovery of motor function.

Since the first part of my work identified that targeting body weight loss by ALA supplementation may lead to better recover from ischemia, we then focused our interest on the mechanism of loss of body weight induced by a neuroinflammation, acknowledged for occurring in stroke. In collaboration with Dr. Rovère, we showed that central injection of lipopolysaccharide (LPS), known to induce neuroinflammation and weight loss, results in specific hypothalamic changes characterized by an increase in the chemokine ligand 2 (CCL2) followed by an increase in pro-inflammatory cytokines and decrease in the orexigenic neuropeptide melanin-concentrating hormone (MCH). While the central injection of CCL2 mimicked LPS-induced neuroinflammation and the decrease of MCH and body weight, the inhibition of its signaling altered the response to LPS. Therefore, this part of my PhD work suggests that CCL2 signaling play a crucial role in neuroinflammation-induced weight loss.

As CCL2 is highly produced by the injured brain and is thought to amplify cerebral damage by promoting leukocyte infiltration into the ischemic brain, the last part of my work explored the hypothesis that ALA may provide stroke protection limiting CCL2 post-stroke overexpression. Among the genes implicated in the deleterious post-ischemic inflammation, we identified overexpression in the ischemic cortex of CCL2 as the higher. In addition, its overexpression in ischemic condition was drastically reduces *in vivo* and *in vitro* by ALA that we also showed protective, in neuronal culture. We then demonstrated that ALA-induced reduction of CCL2 overexpression could directly reduce neurotoxicity *in vitro* and reduced ischemic-induced blood-brain barrier disruption *in vivo*. ALA supplementation could be as disease-modifier targeting toxic CCL2 post-stroke inflammatory response.

To conclude, my PhD works highlight the importance of ALA supplementation to counteract the consequences of stroke, provide new insights into ALA protective mechanisms and open new perspectives how omega-3 ALA enhanced nutrition may affect stroke severity by targeting neuroinflammation. Therefore, such work holds promise as an instigator of further randomized, controlled studies that will be required to confirm the value of ALA in adjunctive therapy for one of medicine's most urgent priorities.

Table des matières

REMERCIEMENTS 2

ABSTRACT 4

TABLE DES MATIERES 5

ABREVIATIONS 8

LISTE DES FIGURES 10

INTRODUCTION 13

I. L'ACCIDENT VASCULAIRE CEREBRAL 13

A. GENERALITES 13

1. Les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques 16

2. Les accidents vasculaires cérébraux ischémiques 16

B. LA PENOMBRE ISCHEMIQUE 17

1. Le concept de pénombre ischémique 17

2. L'intérêt et la visualisation de la pénombre chez les patients 19

C. LES SEQUELLES SUITES A UN AVC 20

1. Les troubles moteurs 21

2. Les troubles cognitifs 22

3. Les troubles émotionnels 24

4. Les troubles sensoriels 24

D. LES MECANISMES PATHOLOGIQUES DE L'AVC ISCHEMIQUE 25

1. Déficit énergétique et excitotoxicité 25

2. Le stress oxydatif et nitrique 29

3. L'altération de la barrière hémato-encéphalique 31

4. L'inflammation cérébrale post-ischémique 35

a) L'infiltration leucocytaire 35

b) L'activation de la microglie 37

c) L'activation astrocytaire 39

d) Les médiateurs de la réponse inflammatoire : les cytokines 41

5. La mort cellulaire induite par l'ischémie cérébrale 45

E. LES MECANISMES DE PROTECTION ENDOGENE DU CERVEAU CONTRE L'AVC 47

1. Le rôle « bénéfique » de l'inflammation cérébrale post-AVC 48

2. Le rôle de la plasticité cérébrale post-AVC 49
II. LES APPROCHES THERAPEUTIQUES CONTRE L'AVC 52
A. DE LA PAILLASSE AUX ECHECS CLINIQUES 52
1. Les différentes cibles identifiées comme induisant une neuroprotection 53
a) Les bloqueurs des canaux calciques 53
b) Les antagonistes des récepteurs au glutamate 53
c) Les molécules anti-inflammatoires 54
d) Les chélateurs de radicaux libres 54
e) Les autres neuroprotecteurs potentiels 55
2. Les raisons du désert thérapeutique dans l'AVC 55
B. LES RECOMMANDATIONS DU STAIR 57
1. La dose du médicament 58
2. La fenêtre thérapeutique 58
3. L'évaluation des séquelles 59
4. Les modèles animaux 60
5. La définition d'un cadre expérimental 60
C. LA PREVENTION DANS LE CADRE DE L'AVC 61
1. La prévention primaire et l'AVC 61
a) Les facteurs de risque non-modifiables de l'AVC 61
b) Les facteurs de risque modifiables de l'AVC 63
2. La prévention secondaire et l'AVC 67
a) Les agents anticoagulants 67
b) Les agents antiplaquettaires 68
D. LA PRISE EN CHARGE ET LES SOINS DES PATIENTS VICTIMES D'AVC 69
1. La thrombolyse par voie intraveineuse 69
2. Les Unités Neuro-Vasculaires 71
3. Les stratégies de récupération fonctionnelle post-AVC 73
a) La stratégie actuelle : la réadaptation 73
b) Les nouvelles stratégies de récupération post-AVC 74
III. LA NUTRITION, UNE APPROCHE THERAPEUTIQUE CONTRE L'AVC 78
A. NUTRITION ET AVC : ENTRE RISQUE ET BENEFICE 78
B. LA NUTRITION APRES UN AVC 80
1. Les troubles nutritionnels post-AVC 80
2. Les études nutritionnelles post-AVC 81
C. LES ACIDES GRAS POLYINSATURES ω-3 ET L'AVC 85
1. Les deux familles d'AGPIs : les ω-3 et les ω-6 85

2. L'intérêt des AGPIs ω-3 à LC au niveau cardiovasculaire et cérébral 91
a) Les AGPIs ω-3 au niveau cardiovasculaire 91
b) Les AGPIs ω-3 au niveau cérébral 93
c) Les AGPIs ω-3 à LC et les facteurs de risque d'AVC 94
D. L'ACIDE ALPHA-LINOLENIQUE ET L'AVC 96
1. Les effets bénéfiques de l'ALA au niveau cardiovasculaire 96
2. Les effets de l'ALA sur l'inflammation 98
3. L'acide α-Linolénique : un potentiel nutraceutique contre l'AVC 99
a) L'ALA : un nouvel agent neuroprotecteur 100
b) L'ALA et le compartiment vasculaire 103
c) L'ALA et la plasticité cérébrale 103
d) L'ALA, un traitement contre l'ischémie cérébrale focale 104
e) La supplémentation nutritionnelle en ALA et l'AVC 105

OBJECTIFS 108

RESULTATS ET DISCUSSION 110

I. UN SUPPORT NUTRITIONNEL EN ALA, PAR VOIE ENTERALE OU PARENTERALE, PERMET DE REDUIRE LES DEFICITS MOTEURS ET COGNITIFS, DANS UN MODELE MURIN D'ISCHEMIE CEREBRALE (ANNEXE 3) 110
A. EFFET DE LA SUPPLEMENTATION NUTRITIONNELLE ORALE EN ALA SUR LA RECUPERATION FONCTIONNELLE POST-ISCHEMIQUE 110
B. LA SUPPLEMENTATION NUTRITIONNELLE INTRAVEINEUSE EN ALA ET LA RECUPERATION FONCTIONNELLE POST-ISCHEMIQUE. 116
C. PROCESSUS CELLULAIRES ET PHYSIOLOGIQUES POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS L'AMELIORATION DE LA RECUPERATION FONCTIONNELLE, APPORTEE PAR LA SUPPLEMENTATION NUTRITIONNELLE EN ALA 120
II. LA SUPPLEMENTATION NUTRITIONNELLE EN ALA REDUIT L'EXPRESSION POST-ISCHEMIQUE DE CCL2 ET SES CONSEQUENCES NEUROTOXIQUES ET INFLAMMATOIRES. 128
III. ROLE ET MECANISMES D'ACTION DE LA CHIMIOKINE CCL2 DANS LA PERTE DE POIDS INDUITE PAR UNE INFLAMMATION CENTRALE (ANNEXE 4) 145

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 151

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 158

ANNEXES 195

Abréviations

AA : Acide Arachidonique

AG : Acide Gras

AGPIs : Acides Gras PolyInsaturés

AHA : American Heart Association

AIT : Accident Ischémique Transitoire

AJR : Apports Journaliers Recommandés

ALA : *Alpha-Linolenic Acid*

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AMPA : alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ASA : American Stroke Association

ATP : Adénosine TriPhosphate

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

Bax : *Bcl-2–associated X protein*

BDNF : *Brain Derived Neurotrophic Factor*

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

CA : Corne d'Ammon

CCL2 : CC-chemokine ligand 2

CICN : *cytokine-induced neutrophil chemoattractant*

CMH-II : Complexe Majeur d'Histocompatibilité II

COX : Cyclo-oxygénase

COX-1 : Cyclo-oxygénase 1

COX-2 : Cyclo-oxygénase 2

DALY : Disability Adjusted Life Years

DASH : *Dietary Approaches to Stop Hypertension*

DGLA : acide dihomo- γ -linolénique

DHA : *Docohexaenoic Acid*

DSC : Débit Sanguin Cérébral

DTC : doppler transcrânien

ECAS : *European Cooperative Acute Stroke Study*

EEG : Electroencéphalogramme

EPA : *Eicosapentaenoic Acid*

FDA : *Food and Drug Administration*

GFAP : *Glial Fribillary Acidic Protein*

GPC : GlyceroPhosphoCholine

HAS : Haute Autorité de Santé

HDL : *High Density Lipoprotein*

HIF-1 : Hypoxia Inducible Factors-1

HSP 70 : *heat shock proteins 70*

HTA : Hypertension Artérielle

I.C.V: IntraCérébroVentriculaire

I.P : intra-péritonéale

I.V : intraveineux

Iba-1 : *ionized calcium-binding adapter molecule 1*

ICAM-1 : *Intercellular Adhesion Molecule 1*

IGF-1 : *Insulin Growth Factor-1*

IL : InterLeukine

IMC : Indice de Masse Corporelle

iNOS : forme inductible de l'oxyde nitrate synthase

IRM : Imagerie à résonnance magnétique

LA : *Linoleic Acid*

LCR : Liquide Céphalo-Rachidien

LDL : *Low Density Lipoprotein*

LOX : Lipo-oxygénase

LOX-5 : Lipo-oxygénase-5

LPS : lipopolysaccharide

LT : Leucotriène

MCA : *Middle Cerebral Artery*

MCAo : *Middle Cerebral Artery occlusion*

MCH : Melanin-Concentrating Hormone

MCP-1 : *Monocyte chemoattractant protein-1*

MEC : Matrice ExtraCellulaire

MMPs : métalloprotéases matricielles

NeuN : *NEUronal Nuclei*

NIHSS : National Institute of Health Stroke Scale

NINDS : *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*

NMDA : N-methyl-D-aspartate

NO : Monoxyde d'azote

NOS : NO Synthase

OGD : Oxygen Glucose Deprivation

OH : hydroxyle

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PA : Pression Artérielle

PAF : Platelet-Activating Factor

PARP : poly (ADP-ribose) polymérase

PG : Prostaglandine

PGI : Prostacycline

PI3K : phosphatidylinositol-3-kinase

PLA_2 : Phospholipase A2

RMN : résonance magnétique nucléaire

RNS : *Reactive Nitrogen Species*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

rt-PA : Activateur recombinant du plasminogène

RV : Réalité virtuelle

S.Phy. : Sérum physiologique

SEF : Stimulation électrique fonctionnelle

Sites AP : sites apurinique/apyrimidique

SNAP-25 : *Synaptosomal-Associated Protein 25*

SNC : Système Nerveux Central

SOD : Superoxyde dismutase

STAIR : *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable*

SVZ : SubVentricular Zone

t-PA : activateur tissulaire du plasminogène (*tissue-type plasminogen activator*)

tDCS : *transcranial direct current stimulation*

TEP : tomoscintigraphie par émission de positon

TG : Triglycéride

TGF-β : *Transforming Growth Factor-β*

TMS : *Transcranial Magnetic Stimulation*

TX : Thromboxane

UNV : Unité Neuro-Vasculaire

VAMP-2 : *Vesicle-Associated Membrane Protein 2*

VEGF : *Vascular endothelial growth factor*

ω-3 à LC : oméga-3 à longue chaine

Liste des Figures

Figure 1 : L'unité neuro-glio-vasculaire comprend les neurones, les cellules gliales, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (non représentées sur le schéma) (figure tirée de (Abbott et al., 2010)). 14
Figure 2 : Les 2 différents types d'AVC : l'AVC hémorragique et l'AVC ischémique. 16
Figure 3 : Devenir de la pénombre suivant la présence ou non de reperfusion. 18
Figure 4 : Représentation infographique de la notion de DALY (Disability Adjusted Life Years) (une infographie de Lamiot). 21
Figure 5 : Graphique représentant le profil temporel des principaux mécanismes physiopathologiques suite à une ischémie cérébrale focale, et leur impact sur la lésion ischémique finale, d'après (Brouns and De Deyn, 2009). 25
Figure 6 : Les différentes étapes d'un potentiel d'action neuronal 26
Figure 7 : Le stress oxydatif et nitrique 30
Figure 8 : Processus d'infiltration des neutrophiles dans le parenchyme cérébral. 36
Figure 9: La polarisation de la microglie est caractérisée par des phénotypes distincts. D'après (Taylor and Sansing, 2013). 39
Figure 10 : Représentation en diagramme de la cinétique d'expression des différentes cytokines dans le cerveau des rongeurs après une ischémie cérébrale, d'après (Nilupul Perera et al., 2006). 41
Figure 11 : Schéma représentant les 4 sous-familles de chimiokines, ... 44
d'après Kohidai, L. (2008). 44
Figure 12 : Représentation graphique du nombre de publications contenant les termes « Neuroprotection » et « Stroke », d'après PubMed en Mars 2016. 52
Figure 13 : Schéma illustrant la fibrinolyse, les flèches bleues étant une stimulation et les flèches rouges une inhibition (d'après Wikipédia) 70
Figure 14 : Les différentes techniques de réadaptation : la thérapie induite par contrainte (a), la marche avec support de poids corporel (b), la stimulation électrique fonctionnelle (c), l'assistance robotique (d), la réalité virtuelle (e), la stimulation cérébrale non invasive (f). 75
Figure 15 : L'acide α-linolénique (ALA ; C18 :3ω-3) et l'acide linoéique (LA ; C18 :2ω-6). En bleu le numéro de l'atome de carbone en partant du carbone α et en rouge le numéro de l'atome de carbone en partant du carbone ω. 85

Figure 16 : Biosynthèse des AGPI ω-6 et ω-3. 86
Tableau 1 : Récapitulatif des études épidémiologiques et cliniques sur l'effet bénéfique de l'ALA sur les maladies cardiovasculaires..... 97
Figure 17 : Représentation schématique de la sous-unité d'un canal K_{2P}..... 101
Figure 18 : Neuroprotection de l'ALA dans un modèle d'ischémie globale transitoire, d'après (Lauritzen et al., 2000)..... 102
Figure 19 : Effet de la supplémentation orale en ALA sur la survie et l'infarctus cérébral après une MCAo de 30 min. 111
Figure 20 : Effet de la supplémentation orale en ALA sur les déficits moteurs post-MCAo, évalués par les tests du Rotarod et du mât. 112
Figure 21 : Effet de la supplémentation orale en ALA sur la récupération cognitive post-ischémique, évaluée par le test de la piscine de Morris. 115
Figure 22 : Effet de la supplémentation *i.v* en ALA sur la survie et l'infarctus cérébral après une MCAo de 30 min. 117
Figure 23 : Effet de la supplémentation *i.v* en ALA sur la récupération motrice et cognitive post-ischémique, évaluée par le test du rotarod et de la piscine de Morris. 118
Figure 24 : Effet de la supplémentation orale en ALA sur la perte neuronale induite par une MCAo de 30 min. 122
Figure 25 : Effet de la supplémentation orale et *i.v* en ALA sur la perte de poids corporel induite par une MCAo de 30 min. 124
Figure 26 : Effet de la supplémentation orale et *i.v* en ALA sur l'atrophie cérébrale et la perte neuronale hippocampique induite par une MCAo de 30 min. 125
Figure 27 : Effet de la supplémentation orale et *i.v* en ALA sur la composition cérébrale en acide gras pré-ischémique. 127
Figure 28 : L'expression de la chimiokine CCL2 est associée à la protection obtenue par la supplémentation orale en ALA après une MCAo de 60min. 130
Figure 29 : Effet dose-réponse de CCL2 sur la viabilité neuronale 24 heures après une OGD de 60 min sur des cultures de neurones en présence ou non d'astrocytes. 133
Figure 30 : Effet d'un prétraitement d'ALA (100μM) sur les dommages neuronaux induits par une OGD de 60 min. 134

Figure 31 : Effet d'un prétraitement d'ALA (100μM) sur l'expression génique de CCL2 après une OGD de 60 min. 137

Figure 32 : Effet du régime enrichi en ALA sur la réponse microgliale 24 heures après une MCAo de 60 min. 139

Figure 33 : Effet du prétraitement d'ALA sur la prolifération et l'activation des cellules microgliales BV2 suite à une OGD. 140

Figure 34 : Effet du régime enrichi en ALA sur l'infiltration leucocytaire, 24h après une MCAo de 60 min. 142

Figure 35 : Effet de l'injection *i.c.v* de LPS sur la perte de poids corporel, et l'expression de cytokines pro-inflammatoires et sur l'expression du peptide orexigénique MCH. 146

Figure 36 : Effet de l'injection *i.c.v* de CCL2 sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires et des peptides orexigéniques dans l'hypothalamus. 147

Figure 37 : Effet de la chimiokine CCL2 sur les neurones à MCH et sur la perte de poids...149

Figure 38 : Importance de la voie de signalisation CCL2 dans la perte de poids induite par le LPS. 150

Introduction

I. L'Accident Vasculaire Cérébral

A. Généralités

Dans le monde, un peu plus de 15 millions d'accidents vasculaires cérébraux (AVC) surviennent chaque année. Parmi les victimes, 30% d'entre elles décèdent, ce qui fait de l'AVC, la seconde cause de mortalité. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) cela représente environ 12% des décès mondiaux. En France, chaque année, 32 000 Français décèdent durant le mois qui suit l'AVC et 120 000 y survivent, en conservant le plus souvent des séquelles. L'AVC représente ainsi la première cause d'invalidité et la deuxième cause de démence après la maladie d'Alzheimer. C'est un problème de santé publique majeure qui a des conséquences importantes sur le patient, sa famille, mais aussi sur la société. Le coût global de la prise en charge des patients d'AVC a été estimé par le Ministère de la Santé à environ 5,3 milliards d'euros, par an (Chevreul et al., 2013).

Hippocrate, le père de la médecine, est le premier à avoir décrit les symptômes de l'AVC, il y a plus de 2400 ans. A cette époque, il l'avait nommé **apoplexie**, du grec ancien *apo,* « au loin » et *pléttô*, « frapper », étymologiquement ce mot signifie « frapper de stupeur». En effet, les personnes développaient brutalement une paralysie et un bouleversement de santé générale. Ce n'est qu'au 17ème siècle, que le Dr. Jacob Wepfer a constaté la présence de saignements cérébraux chez les patients morts d'apoplexie. Il a également montré que l'occlusion d'un vaisseau sanguin cérébral pouvait être à l'origine d'une apoplexie. En 1928, l'apoplexie fut renommée « accident vasculaire cérébral » (AVC) où le terme « accident » souligne l'aspect brutal de la survenue des symptômes.

Lors d'un AVC, aussi nommé « attaque cérébrale », la circulation sanguine est interrompue brutalement, affectant une région plus ou moins importante du cerveau. Le cerveau consomme entre 15 et 20% de l'énergie générée par le corps humain. La majorité de cette énergie est utilisée par l'unité fondamentale du système nerveux central (SNC), le **neurone**. Les neurones sont des cellules excitables spécialisées dans la communication et le traitement d'informations. En effet, un stimulus peut entraîner la formation, dans le neurone, d'un signal bioélectrique (ou influx nerveux), qui pourra être transmis à d'autres neurones ou à d'autres tissus pour les activer (des muscles, des glandes sécrétrices...). L'énergie consommée par les neurones sert à maintenir le potentiel de repos membranaire et restaurer les concentrations ioniques après la transmission synaptique. Cette énergie est aussi utilisée

pour l'activité catabolique et anabolique des neurones et des cellules gliales. L'énergie provient de l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP). Cet ATP est majoritairement issu de la glycolyse aérobie, autrement dit de la phosphorylation oxydative du glucose. La production d'ATP est donc en lien direct avec l'apport sanguin de glucose et d'oxygène. Le cerveau ne présente pratiquement pas de réserve énergétique, la seule source étant le faible stock de glycogène qui se trouve dans les astrocytes. En absence d'oxygène, durant un AVC, la glycolyse anaérobie de ce glycogène fournit aux neurones du lactate, dont l'utilisation par les mitochondries pour produire de l'ATP est insuffisante, pour répondre aux besoins énergétiques. Le cerveau est donc pleinement dépendant du débit sanguin, pour son apport en oxygène et en glucose. En conséquence, même de très courtes interruptions de la circulation cérébrale induisent de profondes perturbations des fonctions neurologiques et mentales. Ceci explique que le débit sanguin cérébral (DSC) doit être parfaitement régulé. Ainsi, la défaillance de la circulation sanguine peut provoquer des dommages, voire la mort du tissu cérébral. Longtemps, les scientifiques ont eu une vision « neurocentrique » de l'AVC, car les neurones sont les cellules cérébrales les plus vulnérables à la privation d'oxygène et de glucose (Lipton, 1999). En réalité, cette privation provoque une réaction complexe impliquant une multitude de voies de signalisation cellulaire altérant toute l'unité neuro-glio-vasculaire (qui comprend les neurones, les cellules gliales, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses) (figure 1 et box 1) (Iadecola, 2004). Lors de l'AVC, la réduction du débit sanguin cérébral a 2 origines, l'hémorragie ou l'occlusion d'une artère cérébrale.

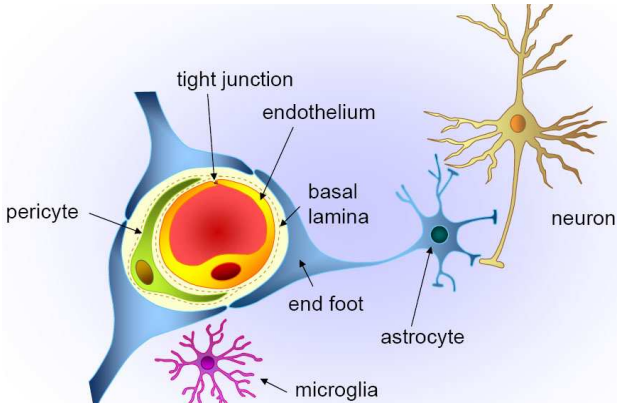


Figure 1 : L'unité neuro-glio-vasculaire comprend les neurones, les cellules gliales, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (non représentées sur le schéma) (figure tirée de (Abbott et al., 2010)).

Box 1. Les cellules de l'unité neurovasculaire

L'unité neurovasculaire (UNV) comprend les cellules vasculaires (cellules endothéliales, péricytes et cellules musculaires lisses), les cellules gliales (astrocytes, microglie et oligodendrocytes) et les neurones.

Les **cellules musculaires lisses vasculaires** produisent la matrice extracellulaire au cours du développement, en fournissant la paroi artérielle avec une capacité de résistance à une pression sanguine élevée. Ce sont des cellules contractiles ayant un rôle crucial dans la régulation du diamètre des vaisseaux sanguins (vasoconstriction / vasodilatation) et du DSC (Lacolley et al., 2012).

Les **cellules endothéliales** tapissent la face interne des vaisseaux sanguins, elles sont en contact direct avec le sang et assurent l'intégrité des vaisseaux. En condition physiologique, elles sont reliées par des jonctions serrées ce qui permet la contribution de l'endothélium dans la perméabilité de la BHE.

Les **péricytes** sont des cellules localisées au niveau de la lame basale de l'endothélium des capillaires qu'elles entourent par de longs prolongements circonférentiels et cytoplasmiques. Les péricytes ont une fonction contractile et un rôle dans la régulation métabolique à travers la régulation du débit sanguin au niveau des capillaires.

Les **astrocytes** (littéralement cellules étoilées) sont les cellules majoritaires du SNC. Elles ont plusieurs fonctions : de par leur densité elles assurent un rôle de support physique cérébral. Elles sont impliquées dans la régulation du DSC en contrôlant le diamètre des vaisseaux. Elles maintiennent l'homéostasie cérébrale, stockent et distribuent les substrats énergétiques, contrôlent le développement des neurones et de la synaptogenèse. Elles ont également un rôle dans la fonction synaptique et dans la protection cérébrale.

La **microglie** est issue du mésoblaste, c'est un ensemble de cellules gliales constituant les cellules immunitaires du SNC, également qualifiée de macrophages résidents. En condition physiologique, la microglie est un senseur de l'état du parenchyme cérébral par sa mobilité ainsi que l'extension et la rétraction continue de leur processus. Ces cellules produisent des cytokines, des radicaux libres et des protéines.

Les **oligodendrocytes** sont également des cellules de soutien. Son principal rôle est la formation de la myéline au niveau du SNC, servant à augmenter la vitesse de propagation de l'influx nerveux. La myéline est une sorte de gaine (lipidique et protéique) enveloppant l'axone des neurones.

Les **neurones** représentent l'unité fonctionnelle du système nerveux. Ces cellules sont capables de générer, de transmettre et/ou de recevoir des informations sous forme d'influx nerveux. Cela est permis par leurs deux propriétés physiologiques : l'excitabilité, autrement dit leur capacité à répondre aux stimuli et de convertir ceux-ci en impulsions nerveuses, et la conductivité, autrement dit la capacité de transmettre ces impulsions.

L'AVC peut être causé par la rupture d'un vaisseau sanguin à l'intérieur du cerveau entraînant une hémorragie, il est alors qualifié d'AVC **hémorragique**. L'hématome qui en résulte, comprime la zone cérébrale atteinte. Lorsque l'obstruction d'un vaisseau sanguin est due à un caillot de sang entraînant une diminution de la circulation sanguine cérébrale, l'AVC est dit **ischémique**, également appelé infarctus cérébral (figure 2).

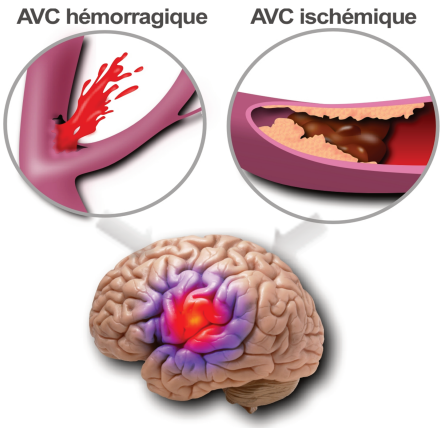


Figure 2 : Les 2 différents types d'AVC : l'AVC hémorragique et l'AVC ischémique.

1. Les accidents vasculaires cérébraux hémorragiques

Les AVC hémorragiques représentent seulement 20% des cas, pourtant le risque de mortalité qui leur est associé est jusqu'à quatre fois plus élevé en comparaison des AVC ischémiques (Andersen et al., 2009). Un AVC hémorragique est provoqué par un saignement cérébral. En plus de priver une partie du cerveau d'oxygène, l'hémorragie détruit d'autres cellules en exerçant une pression sur les tissus, entraînant des dommages plus importants. Elle peut se produire au centre (hémorragie intracérébrale) ou à la périphérie du cerveau (hémorragie subarachnoïde), sous la dure-mère crânienne. Ces hémorragies sont le plus souvent dues à une rupture d'anévrisme. Un anévrisme est une section affaiblie de la paroi des vaisseaux sanguins qui se gonfle de sang et fait saillie, dont la forme est généralement celle d'un sac (anévrisme sacciforme). L'hypertension artérielle ou un traumatisme peut provoquer sa rupture, entraînant l'hémorragie. La rupture d'anévrisme est responsable de la majorité des AVC mortels chez les jeunes personnes (moins de 45 ans).

2. Les accidents vasculaires cérébraux ischémiques

Les AVC ischémiques sont les plus fréquents, ils représentent plus de 80% des cas. Le terme ischémie provient du grec ancien « *iskhaimos* », de *iskhein,* pour restriction, et *haima,* pour sang. L'obturation d'une artère cérébrale peut être la résultante d'une :

- Athérosclérose, à savoir une lésion de la paroi des artères carotides, provoquant une diminution du diamètre interne du vaisseau, voire son obstruction totale. Cela représente 40 à 50% des AVC ischémiques.
- Embolie cérébrale qui résulte de la formation d'un thrombus (ou caillot) bloquant l'artère. Ce caillot s'est formé à l'extérieur du cerveau, dans le cœur par exemple, et a été transporté par la circulation sanguine. Le caillot peut également provenir des artères carotides (dans le cou), à partir de plaques d'athérome. Cela représente 30% des AVC ischémiques.

Les AVC ischémiques peuvent être également classés selon l'étendue de la restriction du DSC. En effet, lors d'une interruption de l'ensemble de la circulation cérébrale, c'est une **ischémie cérébrale globale**. C'est d'ailleurs ce qui arrive lors d'un arrêt cardiaque. Lorsque la réduction du DSC est limitée à une région cérébrale distincte, c'est une **ischémie cérébrale focale**, due à une athérosclérose ou une embolie cérébrale. Lors d'un AVC ischémique focal, il existe un gradient de perfusion qui diminue en fonction de la proximité de la zone irriguée par l'artère obstruée. Ainsi, il existe une zone où la circulation sanguine est partiellement maintenue grâce aux vaisseaux sanguins collatéraux, provenant du polygone de Willis (Liebeskind, 2010). Ce gradient de perfusion participe à la formation d'un état transitoire, où les neurones sont entre « la vie et la mort ». Cet état, entre la lésion irréversible et le tissu sain, est nommé la « **pénombre ischémique** ».

B. La pénombre ischémique

1. Le concept de pénombre ischémique

Dans les années 1970, plusieurs études ont été effectuées sur le babouin, car leur cerveau a un ratio substance blanche/substance grise et une vascularisation similaire au cerveau humain (Lake et al., 1990). Ces études ont permis d'établir un lien entre le DSC et l'activité électrique du cerveau, reflétant l'activité neuronale, ainsi qu'un lien entre le DSC et l'homéostasie ionique, reflétant l'intégrité membranaire de ces neurones. Le DSC basal est entre 0,50 et 0,55 ml par minute et par gramme de tissu cérébral ($ml.min^{-1}.g^{-1}$). Lorsque ce débit est sous le seuil de 0,16-0,17 $ml.min^{-1}.g^{-1}$, une interruption de l'activité neuronale est observée par un électro-encéphalogramme (EEG) plat (Trojaborg and Boysen, 1973). Si ce débit est inférieur à 0,10 $ml.min^{-1}.g^{-1}$, ce qui représente 20% du DSC basal, un déficit énergétique se produit, entraînant l'altération des pompes ioniques, ce qui a pour conséquence

la mort neuronale (Astrup et al., 1977). Ainsi, plus le DSC est faible plus les dommages sont importants.

Lors d'un AVC, il existe une zone cérébrale où le DSC se trouve entre ces deux seuils. Dans cette zone cérébrale, l'EEG est plat : il n'y a plus d'activité neuronale. Pourtant, les neurones de cette zone ne présentent pas de défaillance ionique, ce qui leurs permet de maintenir leur potentiel de membrane et donc l'intégrité de leur membrane. Cette absence d'altération des pompes ioniques permet d'éviter un phénomène délétère, la dérégulation du système glutamatergique (*cf. Chapitre I.D.1*). Plus concrètement, **les neurones se trouvant dans cette zone sont fonctionnellement inactifs mais leur intégrité physique est intacte**. Cette partie du cerveau ischémié s'appelle la **pénombre ischémique** (Astrup et al., 1981). Cette zone forme un anneau autour du « cœur » ischémique, là où l'ischémie est la plus sévère (entre 10 et 20% du DSC initial). Dans ce cœur ischémique, le déficit énergétique et la défaillance des pompes ioniques se sont déjà développés et les dommages sont irréversibles.

Dans la pénombre, la survie neuronale reste fragile et la lésion cérébrale pourra continuer à se développer en fonction de la sévérité de l'ischémie, c'est à dire de la durée d'occlusion et de la surface touchée (Jones et al., 1981). Si la restauration de la circulation s'effectue rapidement, la lésion cérébrale ainsi que les dommages liés à cette lésion peuvent être réduits (Selman et al., 1990; Weinstein et al., 1986). À l'inverse, si la circulation n'est pas rétablie, la pénombre ischémique aura le même destin que le cœur ischémique, et les dommages s'étendront à toute cette région. L'existence de la pénombre, et plus particulièrement de cet état évolutif – soit vers une survie, soit vers une mort cellulaire – est associée à une certaine notion de « réversibilité » des altérations, en fonction de l'état du DSC (figure 3).

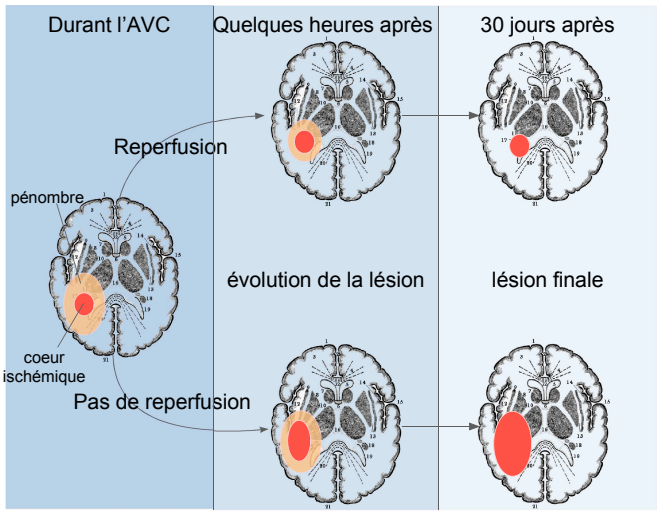


Figure 3 : Devenir de la pénombre suivant la présence ou non de reperfusion.

2. L'intérêt et la visualisation de la pénombre chez les patients

La pénombre ischémique a été observée chez les patients (Furlan et al., 1996; Read et al., 1998). Elle reprend les mêmes notions de survie neuronale dépendantes de la sévérité de l'ischémie, ainsi que la réversibilité des altérations (Kaufmann et al., 1999). Séparer la pénombre du cœur ischémique est cruciale dans l'approche thérapeutique, puisque la pénombre délimite un tissu auquel la mort apoptotique pourrait être éviter. D'ailleurs, l'indice de la récupération potentielle a été défini comme le ratio suivant : aire de la pénombre / (aire de la pénombre + l'aire de l'infarctus). Plus cet indice est élevé, plus le pronostic est favorable, et inversement, y compris en présence d'une restauration du flux sanguin (Schaller, 2007). Néanmoins, la restauration précoce du flux sanguin cérébral est l'option principale qui permet d'améliorer la récupération et le pronostic vital des patients victimes d'AVC (Olsen et al., 1983).

Des techniques d'imageries non invasives ont été mises en place pour visualiser la pénombre. Le principe étant de « photographier » l'état du parenchyme cérébral ainsi que celui des vaisseaux, à un instant donné. La neuro-imagerie joue un rôle crucial, tout d'abord pour confirmer le diagnostic de l'AVC, s'il est ischémique ou hémorragique, puis pour localiser le vaisseau obstrué, et donc permettre une prise de décision rapide, quant aux stratégies thérapeutiques à mettre en œuvre. L'imagerie permet ensuite le suivi clinique des patients victimes d'AVC ischémique, notamment le suivi des évolutions de l'infarctus et de la pénombre. La première technique de détection des occlusions intracrâniales, comme l'artère cérébrale moyenne, est le doppler transcrânien (DTC) (Mattle et al., 1988) (Zanette et al., 1989). Le DTC est une technique qui permet d'enregistrer, de manière non invasive, le flux ou la vitesse des globules rouges dans les gros troncs artériels intracrâniens. Cette technique a permis de tirer des corrélations entre le DSC et la récupération motrice après un AVC (Halsey, 1988). Avec les avancées de l'imagerie médicale, la première technique d'imagerie, à proprement parler, qui fut employée est la tomoscintigraphie par émission de positon dénommée TEP. Cette technique consiste à mesurer l'activité métabolique d'un organe au travers de l'émission produite par les positons issus de la consommation de glucose fluoré. Après son injection, l'accumulation du glucose radioactif dans les différentes régions du cerveau va être observé par les capteurs du TEP. Cela permet d'obtenir des informations importantes sur le DSC, le volume sanguin cérébral mais aussi sur le métabolisme de l'oxygène ainsi que son extraction (Baron, 1999). Cependant, l'utilisation de cette technique

dans le cadre de l'AVC reste limitée, car la radioactivité décroît rapidement (Scalzo et al., 2015).

À l'heure actuelle, l'imagerie par résonnance magnétique (IRM) est l'examen radiologique de référence pour diagnostiquer une ischémie cérébrale. L'IRM est une technique d'imagerie médicale basée sur le phénomène physique de résonance magnétique nucléaire (RMN). Il s'agit d'observer la RMN des protons de l'eau contenue dans l'organisme, permettant l'observation des altérations des tissus par des différences de densité et de relaxation de l'eau. L'IRM est l'examen d'imagerie à privilégier, en raison de sa sensibilité et de l'absence d'irradiation (Sacco et al., 2013). Il permet de confirmer le diagnostic. Il permet également de localiser avec précision la zone mal irriguée, notamment la pénombre ischémique. L'IRM aide à la décision thérapeutique, en définissant au mieux les risques et les bénéfices de l'administration d'un agent thrombolytique, ainsi que l'état de la pénombre ischémique.

C. Les séquelles suites à un AVC

Etant donné que la majorité des patients victimes d'AVC survivent à l'accident, les conséquences à long terme, d'une attaque, représentent un problème de santé majeur. En effet, en 2007, 62 millions de patients ont survécu à leur AVC, et plus de la moitié d'entre eux présente des séquelles motrices et/ou cognitives. Le coût de l'AVC a été évalué approximativement à 51 millions d'années perdues en raison d'une mauvaise santé, d'un handicap ou d'une mort précoce (Calculé par la mesure du DALY « *Disability Adjusted Life Years* » ; figure 4) (Johnston et al., 2009; Strong et al., 2007). D'après le Ministère de la Santé, il y a 771 000 personnes avec un antécédent d'AVC en France, dont 505 000 présentent des séquelles. Selon les données recueillies par le registre des AVC de Dijon, près de 60 % des personnes ayant survécu à un AVC présentent des symptômes un an après l'accident, dont 25% un handicap « léger ou modéré » et 34% ne peuvent marcher sans assistance (Bejot et al., 2007a).

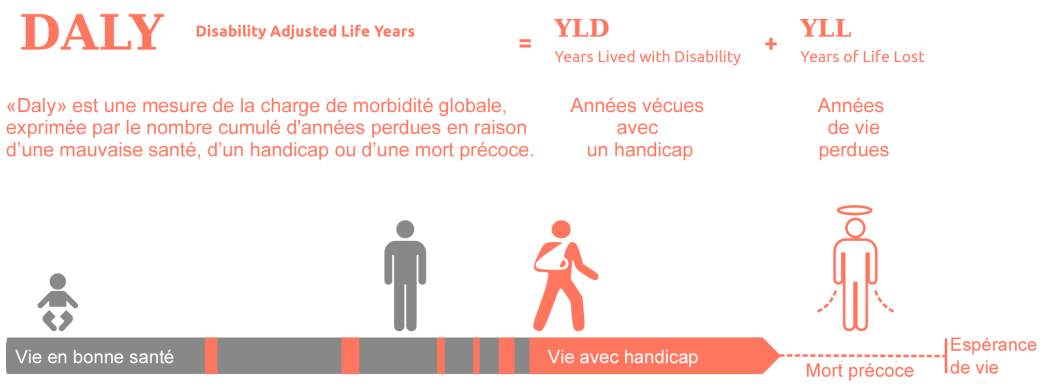


Figure 4 : Représentation infographique de la notion de DALY (Disability Adjusted Life Years) (une infographie de Lamiot).

Chaque partie du cerveau régissant des fonctions et des capacités différentes, les conséquences d'un AVC varient selon la partie du cerveau lésée et l'étendue de la partie endommagée. L'AVC peut avoir des effets physiques, émotionnels, comportementaux et sociaux. Il peut modifier la capacité d'une personne à penser et à apprendre. Le cerveau comportant des voies qui « s'entrecroisent », les dommages de l'hémisphère droit affectent le côté gauche du corps, et inversement.

1. Les troubles moteurs

La conséquence la plus commune après un AVC est le déficit moteur, qui peut être considéré comme une perte ou une limitation du contrôle musculaire, voire de la mobilité (Jorgensen et al., 1995a). Dans 80% des cas, les troubles moteurs post-AVC affectent typiquement le contrôle musculaire d'un côté du corps, en partant du visage à la jambe (Langhorne et al., 2009). La paralysie est initialement totale, les muscles sont incapables de la moindre activité. Après quelques jours, ou plus rarement quelques semaines, des contractions musculaires sont à nouveau possibles, mais cette motricité renaissante est altérée et n'autorise que des mouvements grossiers et sans précision. Ce handicap moteur est l'hémiparésie, ce qui correspond à la paralysie partielle d'un hémicorps, plus ou moins accentuée sur certains membres (bras en retrait, jambe boutante). À la différence de l'hémiplégie, la paralysie n'est pas totale et le patient peut donc mobiliser son hémicorps mais avec une force musculaire inférieure à la normale. Au déficit moteur s'ajoutent des troubles du tonus caractérisé par une résistance à l'étirement des muscles (raideur musculaire ou spasticité) qui donne l'attitude caractéristique de l'hémiplégique : flexion du membre supérieur, main fermée, extension du membre inférieur. Cette hémiplégie entraîne une gêne, voire une dépendance dans les tâches de la vie quotidienne. L'AVC est la cause la plus fréquente d'hémiplégie, car 80% des AVC

ischémiques sont dus à l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (appelée artère sylvienne). Cette artère irrigue, en superficie, la majeure partie de la surface latérale de l'hémisphère et en profondeur, les ganglions de la base et la capsule interne. Ces différentes structures sont impliquées, entre autres, dans la fonction motrice. Le contrôle des mouvements est aussi régi dans ces structures ; c'est pourquoi très souvent des troubles de la coordination, ou ataxie, sont observés chez les patients victimes d'AVC. L'apraxie est aussi un trouble fréquent suite à un AVC (Heilman et al., 1997). L'apraxie est un trouble qui rend une personne incapable de réaliser un ou plusieurs mouvements, notamment sur commande. C'est un déficit neurologique affectant la conceptualisation et l'exécution du geste proprement dit, même si l'ensemble des fonctions motrices et sensitives de base est normal. Ces différents troubles moteurs entraînent généralement des altérations de la démarche. Si le déficit moteur est le plus habituel, d'autres troubles accompagnent généralement les victimes d'un AVC, notamment ceux d'ordre cognitif.

2. Les troubles cognitifs

Les troubles cognitifs après un AVC sont fréquents et peuvent entraîner une invalidité avec des impacts importants sur la qualité de vie et l'indépendance des patients (Tatemichi et al., 1994). La cognition inclut une multitude de processus intellectuels telles que l'attention, la fonction exécutive (planification, organisation, contrôle), la compétence visuospatiale (recherche visuelle, dessiner...), la mémoire (rappel et reconnaissance d'une information visuelle et verbale), et le langage. Une simple tâche, telle que se rappeler d'une liste de course, fait appel à la mémoire mais également à l'attention et au langage. La cognition est donc complexe et difficilement classifiable. La référence absolue pour déterminer une atteinte cognitive, ou démence, est une batterie de tests neuropsychologiques couvrant divers domaines, avec des informations normatives pour indiquer des troubles spécifiques à un processus. Ces tests sont utilisés également pour quantifier la détérioration cognitive dans la maladie d'Alzheimer, première cause de démence dans le monde. La démence suite à un ou plusieurs AVC est dite « vasculaire ». Environ 30% des patients victimes d'AVC développent une démence dans l'année suivant l'accident (Cullen et al., 2007), représentant ainsi d'après l'OMS, la deuxième cause de démence, après la maladie d'Alzheimer. L'obstruction de l'artère cérébrale moyenne est associée à une plus grande probabilité de troubles cognitifs (Jaillard et al., 2010).

Dans les années 1990, deux études ont montré que l'attention, la mémoire, le langage, et l'orientation étaient les plus affectés suite à un AVC. Des déficits d'ordre visuospatial et de

raisonnement ont également été observés chez ces patients (Hochstenbach et al., 1998; Tatemichi et al., 1994). Aujourd'hui, il est établi qu'après un AVC, les troubles de l'attention et des fonctions exécutives sont les plus fréquents par rapport aux troubles mnésiques. En effet, seulement la moitié des victimes souffrant de démence vasculaire présente des troubles mnésiques (Feldman et al., 2003). Néanmoins, il est possible que les déficiences d'attention et des fonctions exécutives soient prédominantes après un AVC, car ce sont des processus souvent évalués par des tests dépendants du temps contrairement aux tests mnésiques (Cumming et al., 2013). La majorité des patients présente un ralentissement cognitif, autrement dit une lenteur prononcée dans le traitement des informations (Hochstenbach et al., 1998), qui est un prédicateur négatif de l'autonomie des survivants d'un AVC (Narasimhalu et al., 2011).

En clinique, deux des déficits cognitifs les plus importants après un AVC sont l'héminégligence spatiale et l'aphasie (Cumming et al., 2013). En effet, 85% des patients en phase aiguë d'une ischémie de l'hémisphère droit, présentent une négligence visuelle gauche (Azouvi et al., 2006). La lésion empêche le cerveau de répondre aux signaux qui lui sont présentés du côté gauche. Le patient se heurte aux obstacles situés sur sa gauche, ne lit que la partie droite d'un texte, ne mange que le côté droit du contenu de son assiette, etc... Malgré une fréquente récupération spontanée durant la première semaine après l'accident (Ringman et al., 2004), au moins un tiers des patients présente une héminégligence importante, plusieurs mois après l'AVC (Karnath et al., 2011).

Suite à un AVC, une perte totale ou partielle de la capacité de communiquer par le langage peut survenir chez la victime. Ce trouble est appelé aphasie. L'aphasie est une incapacité de parler et/ou de comprendre, l'écrit et/ou l'oral, et ceci en l'absence de troubles sensoriels (surdité par exemple). L'aphasie est donc une lourde conséquence de l'AVC, et ce trouble persiste chez 10 à 38% des survivants d'un AVC (Pedersen et al., 1995; Yoon et al., 2015). Plusieurs évaluations ont été effectuées pour mesurer l'impact de l'aphasie dans la qualité de la vie des patients victimes d'AVC (Hilari et al., 2003). L'aphasie est souvent accompagnée de troubles émotionnels et psychosociaux (Hemsley and Code, 1996). La communication étant la première étape d'une relation dans notre société, l'aphasie a été reportée comme étant un prédicateur de désordres émotionnels, et d'isolation sociale (Thomas and Lincoln, 2008).

3. Les troubles émotionnels

Suite à un AVC, les patients présentent généralement une anxiété, et ont tendance à se replier sur eux-mêmes. Le trouble émotionnel ayant la plus grande importance clinique est la dépression post-AVC.

La symptomatologie de la dépression post-AVC est dominée par l'humeur dépressive, et l'anhédonie, qui est l'incapacité à ressentir du plaisir. La perte d'énergie, les difficultés de concentration et la lenteur psychomotrice sont également fréquentes, ainsi que les signes organiques que représentent la perte d'appétit et l'insomnie. Environ un tiers des patients ayant subi un AVC développe une dépression dans l'année qui suit (Hackett et al., 2005; Robinson, 2003). La plupart de ces études ont exclu les patients aphasiques ou porteurs de troubles cognitifs préalables, compte tenu des difficultés de diagnostics. Contrairement aux autres séquelles de l'AVC, le risque de dépression n'est pas lié à un territoire cérébral spécifique (Carson et al., 2000). En revanche, son développement est favorisé par la gravité de la dépendance physique, de l'existence de troubles de la marche, ou encore de l'incontinence urinaire (Kouwenhoven et al., 2011). Le sexe et l'âge semblent influencer sur la fréquence de dépression post-AVC. En effet, elle semble prédominante chez les femmes, et, avant 70 ans, le risque de développer une dépression post-AVC serait plus important. La dépression post-AVC est en partie la conséquence des réactions psychologiques engendrées par la survenue d'une perturbation brutale et durable des relations d'un sujet avec son environnement. La période la plus à risque de survenue de la dépression est sujette à discussion. L'incidence serait plus importante dans le premier mois suivant l'AVC que pour le reste de la première année (Kouwenhoven et al., 2011). Cette survenue précoce de la dépression pourrait, en retardant la rééducation, avoir d'importantes répercussions sur les séquelles à long terme de l'AVC. Globalement, et quelle que soit l'évolution de la dépression, la présence d'une dépression post-AVC est considérée comme un facteur de mauvais pronostic (Hadidi et al., 2009). En effet, la mortalité est multipliée par 3,5 par rapport à celle de patients sans dépression, le délai de récupération et l'importance des séquelles sont augmentés, et enfin la qualité de la vie du patient et de son entourage est significativement réduite.

4. Les troubles sensoriels

Les troubles sensoriels désignent l'ensemble de troubles de la perception qui affectent les organes des sens (yeux, nez, langue, oreilles, peau). Après l'AVC, les troubles sensoriels chez les victimes se manifestent par (1) des sensations souvent désagréables dans les

membres paralysés (fourmillements ou parasthésie, picotements, brûlures) qui peuvent parfois être difficilement supportables, (2) une insensibilité au toucher, à la piqûre, au froid et/ou au chaud, et (3) une difficulté à reconnaître les objets par le toucher. Les victimes d'un AVC peuvent présenter une perte de la vision d'un œil (cécité unilatérale, suivant l'hémisphère touché) ou de la moitié du champ visuel pour chaque œil (hémianopsie), ou encore une vue double (diplopie).

D. Les mécanismes pathologiques de l'AVC ischémique

Les lésions cérébrales induites par un AVC ischémique transitoire ou permanent résultent de l'interaction complexe entre de multiples voies conduisant à la mort cellulaire par nécrose et/ou apoptose : le déficit énergétique, l'excitotoxicité, le stress oxydatif et nitrique et l'inflammation, tous intervenant selon une chronologie définie. Ces processus qui se chevauchent, causent des lésions à toute l'unité neuro-glio-vasculaire (figure 5).

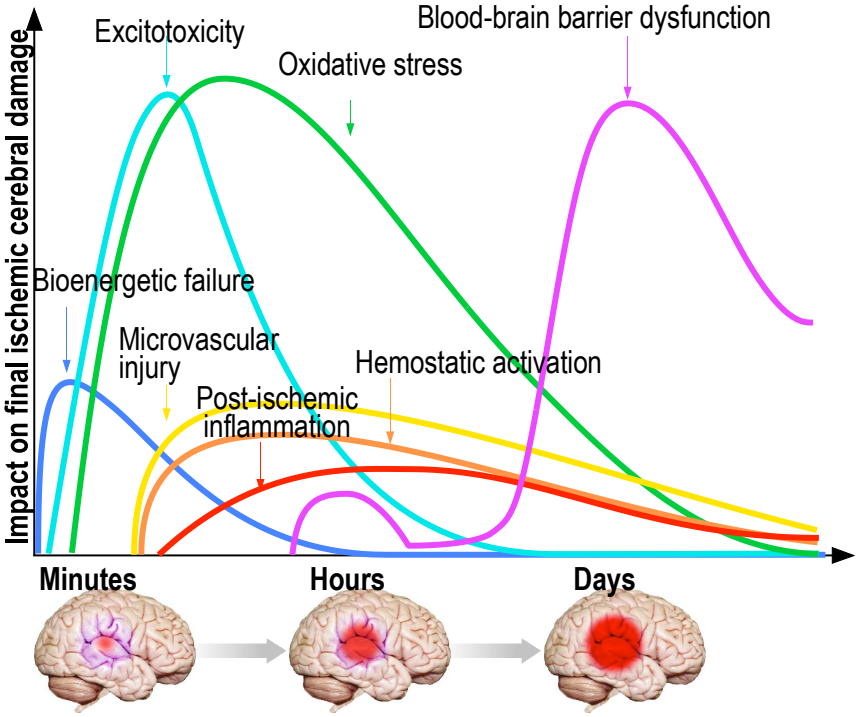


Figure 5 : Graphique représentant le profil temporel des principaux mécanismes physiopathologiques suite à une ischémie cérébrale focale, et leur impact sur la lésion ischémique finale, d'après (Brouns and De Deyn, 2009).

1. Déficit énergétique et excitotoxicité

Le cerveau consomme une importante quantité d'oxygène et de glucose, et dépend principalement de l'énergie produite par la phosphorylation oxydative du glucose. Cette

phosphorylation va donner lieu à la production du principal substrat énergétique, l'ATP. 70% de cet ATP est hydrolysé par les pompes ioniques Na^+/K^+ ATPase, qui servent à maintenir et/ou restaurer continuellement l'inégalité de répartition des ions Na^+ et K^+ de part et d'autre de la membrane plasmique. Cette asymétrie ionique crée une différence de potentiel électrique transmembranaire (potentiel de membrane). Les ions Na^+, Ca^{2+} et Cl^- sont majoritairement extracellulaires contrairement à l'ion K^+, majoritairement intracellulaire. Cette asymétrie ionique est nécessaire à la propagation des potentiels d'action des neurones. Le potentiel d'action se présente sous la forme d'une onde à trois phases (*figure 6*) : (1) la phase de dépolarisation, due à une entrée de Na^+ dans la cellule ; puis (2) la phase de repolarisation, due à deux phénomènes, d'une part l'inactivation de la conductance sodique (arrêt de l'entrée du Na^+), et d'autre part, l'activation de la conductance potassique (sortie des ions K^+) ; et enfin (3) l'hyperpolarisation correspondant à une sortie en excès d'ions K^+. Ensuite, les pompes Na^+/K^+ ATPase rétablissent les concentrations ioniques.

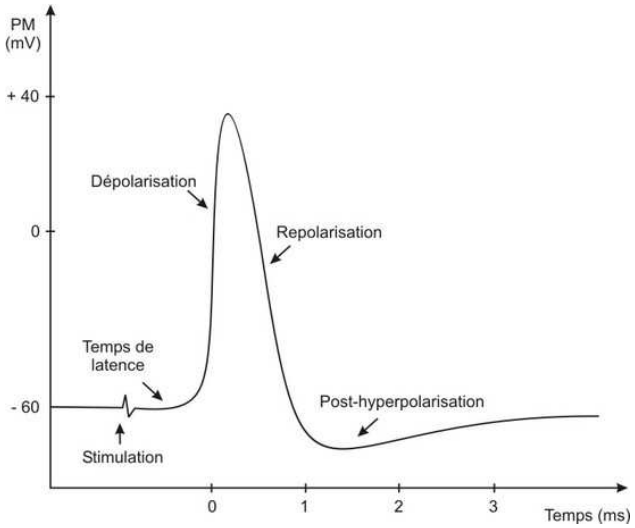


Figure 6 : Les différentes étapes d'un potentiel d'action neuronal

Lors d'une interruption du DSC, le déficit énergétique engendré par l'absence d'oxygène et de glucose, ne permet plus le maintien des gradients ioniques, et plus particulièrement le potentiel de repos des neurones, ce qui entraîne une dépolarisation massive des neurones. Cette dépolarisation fait suite à la consommation de l'ATP et à l'entrée cellulaire des ions Na^+, Ca^{2+} et Cl^- et la sortie du K^+ (Katsura et al., 1994). La dépolarisation des neurones va entraîner le relargage des neurotransmetteurs dans la fente synaptique, induisant l'activation de leurs récepteurs spécifiques. Cette libération est due à l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants. Étant donné le déficit énergétique, il n'y a plus de recapture de ces neurotransmetteurs depuis la fente synaptique, amplifiant l'activation de leurs récepteurs spécifiques. Parmi ces neurotransmetteurs se trouvent le **glutamate**, le principal

neurotransmetteur excitateur cérébral. Son accumulation importante entraîne un phénomène extrêmement délétère, **l'excitotoxicité** (Choi, 1988; Rossi et al., 2000). Celle-ci est due à une stimulation excessive des différents récepteurs ionotropiques (protéines transmembranaires ouvrant un canal ionique) du glutamate, tels que les récepteurs alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA), les récepteurs N-methyl-D-aspartate (NMDA) et les récepteurs kaïnate, et enfin les différents récepteurs métabotropiques (protéines membranaires activant une voie de signalisation intracellulaire). La toxicité du glutamate provient de l'entrée massive du Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule, qui entraîne la nécrose des neurones. En effet, tous les récepteurs activés par le glutamate ont pour finalité d'augmenter la concentration calcique intracellulaire. Les récepteurs NMDA sont perméables aux ions Ca^{2+}, Na^{+} et K^{+}, mais quand le potentiel membranaire du neurone est au repos, la liaison du glutamate sur le récepteur n'est pas suffisante pour permettre l'entrée des ions par le canal. Une dépolarisation de la membrane plasmique est nécessaire pour lever le blocage du canal par l'ion magnésium (Mg^{2+}) (Nowak et al., 1984). Les récepteurs AMPA sont perméables au Na^{+} et K^{+}, et leur activation va induire un influx de Na^{+} et donc la dépolarisation membranaire des neurones, permettant l'activation des récepteurs NMDA en levant le blocage du Mg^{2+}. Une fois le canal ouvert, sa perméabilité au Ca^{2+} va renforcer l'accumulation calcique intracellulaire, tout comme l'activation des récepteurs métabotropiques du glutamate *via* la phospholipase C et la voie de signalisation inositol-triphosphate (Paschen, 1996). L'entrée de Na^{+} et de Cl^{-} va entraîner l'entrée d'eau dans la cellule, et induire la formation de l'œdème cytotoxique, visible dans les temps précoces par l'IRM.

Des modèles animaux reproduisant l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAo, pour « *Middle Cerebral Artery occlusion* ») (box2) – le type d'AVC le plus commun – ont confirmé que les dommages sont plus rapides et plus sévères au centre du territoire ischémique (le cœur ischémique). Au niveau de ce cœur ischémique, l'excitotoxicité va être dévastatrice et mener à la nécrose du tissu cérébral (Moskowitz et al., 2010). La dépolarisation péri-infarctus, qui va donc se dérouler à proximité du cœur ischémique, c'est à dire dans la pénombre, va aussi conduire à une mort cellulaire plus lente, l'apoptose. Durant l'ischémie, la concentration calcique va atteindre entre 50 et 100µM, ce qui représente une augmentation d'un facteur 500 à 1000 fois supérieures à la normale. Cette augmentation active toutes les voies de signalisation calcique déclenchant une multitude de processus délétères comme le stress oxydatif, l'inflammation post-ischémique, la fragmentation de l'ADN et des protéines du cytosquelette, pour conduire à une mort cellulaire.

Box 2. Les modèles expérimentaux d'AVC

De nombreux modèles expérimentaux ont été développés pour étudier la physiopathologie de l'AVC. Voici les principaux modèles utilisés dans les laboratoires de recherche (Bacigaluppi et al., 2010). Les 2 principaux modèles reproduisent l'ischémie cérébrale focale et globale.

L'ischémie cérébrale focale est caractérisée par une réduction du DSC dans une région cérébrale distincte. Plusieurs modèles permettent d'obtenir ce type d'ischémie.

L'**occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAo)** est le modèle le plus utilisé, car il correspond à l'occlusion de l'artère sylvienne chez l'Homme (80% des AVC ischémiques). L'occlusion peut être proximale (pMCAo), et distale (dMCAo). Les **pMCAo** sont induites par l'introduction d'un filament siliconé dans l'artère cérébrale primitive et qui remonte jusqu'à l'artère carotide interne. L'ostium de l'ACM est ainsi obstrué. La sévérité des lésions varie en fonction du temps d'occlusion (entre 30 et 120 min), une fois le filament retiré une reperfusion du tissu peut être observée. En cas d'occlusion permanente le filament n'est pas retiré. Les **dMCAo** sont induites par une craniotomie pour manipuler directement les branches superficielles de l'ACM. Les structures profondes (hippocampe, hypothalamus, thalamus...) sont épargnées par ce modèle. L'ischémie cérébrale focale peut également être obtenue par une occlusion dite « thrombotique ».

Des **modèles thromboemboliques** ont été développés chez l'animal, ils sont induits par l'injection de caillots synthétiques dans l'artère carotide interne. Un modèle utilisant l'**endothéline-1 (ET-1)** a également été développé. Cela consiste en l'injection intracérébrale de l'ET-1, une substance vasoconstrictrice, réduisant le DSC dans la zone d'injection. Le **modèle photo-thrombotique** permet d'induire des lésions au niveau cortical par photo-activation d'un colorant sensible à la lumière et injecté au préalable.

L'ischémie cérébrale globale est caractérisée par une interruption de l'ensemble de la circulation cérébrale. L'ischémie globale est utilisée pour étudier les dommages cérébraux suite à un accident cardiaque. Elle peut être induite par plusieurs approches.

L'**occlusion des 4 vaisseaux** consistant en l'obstruction réversible des artères carotides communes et l'obstruction permanente des artères vertébrales par cautérisation électrique. Cela entraîne une ischémie, reproductible, bilatérale du cerveau et du tronc cérébral.

L'**occlusion des 2 vaisseaux** consistant en l'occlusion des 2 artères carotides communes, combinée avec une induction d'hypotension, entraîne une lésion spécifique au niveau du CA1 de l'hippocampe, du caudate putamen et dans le néocortex.

2. Le stress oxydatif et nitrique

Le stress oxydatif joue un rôle majeur dans les dommages ischémiques, lors d'une production excessive d'oxygène ou de ses dérivés chimiques, communément appelés « **espèces réactives oxygénées** » (**ROS**, pour *Reactive Oxygen Species*) (Cao et al., 1988). Ces ROS sont donc des espèces chimiques oxygénées telles que des radicaux libres (molécules chimiques très actives, due à la présence d'électrons de valence non appariés), des ions oxygénés et des peroxydes (composés chimiques contenant un groupe fonctionnel de formule générale R-O-O-R'). Il peut s'agir de l'anion superoxyde O_2^-, de l'oxygène singulet $O_2\cdot$, du radical hydroxyle HO·, ou encore du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (figure 7). Normalement, ces ROS jouent le rôle de second messager, et agissent directement sur les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire, l'induction mitotique, les défenses immunitaires, la senescence cellulaire, l'apoptose, l'élimination de molécules toxiques (Bergendi et al., 1999), et la vasodilatation d'artères cérébrales (Paravicini et al., 2006).

Ces espèces chimiques oxygénées peuvent être liées à un ou plusieurs atomes d'azote : ce sont les « **espèces réactives azotées** » (**RNS**, pour *Reactive Nitrogen Species*). Il peut s'agir du monoxyde d'azote NO, du peroxynitrite $ONOO^-$, et du nitrogène dioxyde $\cdot NO_2$. Ces RNS sont générées en conditions physiologiques. Le NO est produit dans les tissus biologiques à partir de la L-arginine et de l'oxygène par plusieurs enzymes, les NO synthases (NOS), qui sont des hémoprotéines (protéines à hème, un cofacteur contenant un métal). Le NO est libéré par les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules hépatiques et les neurones. Cette libération a un rôle dans la signalisation neuronale, la pression artérielle, la relaxation musculaire lisse et la réponse immunitaire. Comme pour le stress oxydatif, le stress nitrique correspond à production excessive de RNS (Ridnour et al., 2004).

L'ischémie entraîne une production excessive de ces ROS/RNS (McCord, 1985), par l'activation de plusieurs enzymes dont la NOS (Iadecola et al., 1995) et la cyclo-oxygénase 2 (COX-2). Les défenses anti-oxydantes sont alors submergées et ne sont plus capables de protéger la cellule des dommages oxydatifs. En effet, le cerveau est riche en lipides péroxydables, et au contraire, pauvre en enzymes anti-oxydantes endogènes (comme la catalase, la superoxyde dismutase (SOD), la glutathion peroxydase et la glutathion réductase) et d'autres molécules endogènes (par exemple le glutathion, les vitamines A, C et E) (figure 7) (Duffy et al., 1998; Vatassery, 1998). Le SNC, et plus particulièrement les neurones, sont plus vulnérables au stress oxydatif, en raison de leur métabolisme élevé et leur faible capacité de régénération (Smith et al., 2013).

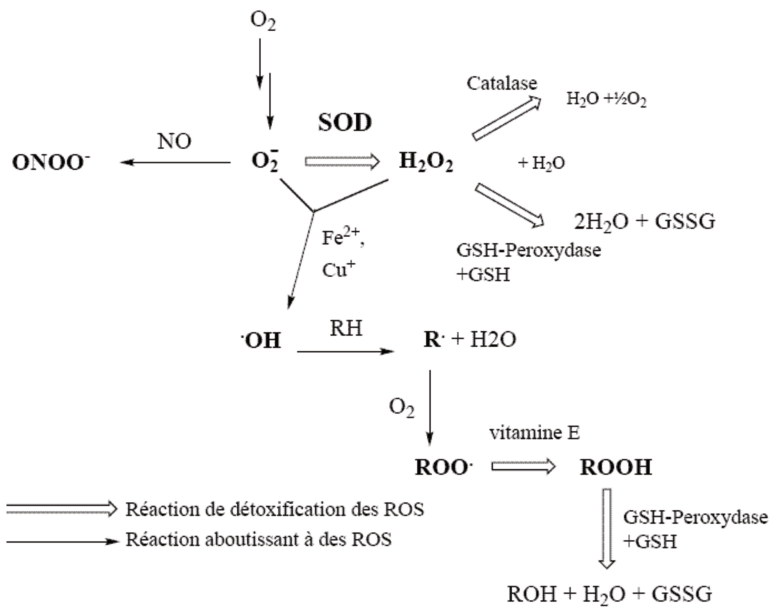


Figure 7 : Le stress oxydatif et nitrique

Ces espèces réactives provoquent principalement, la peroxydation des lipides membranaires et des altérations des protéines et de l'ADN (Allen and Bayraktutan, 2009).

Les ROS/RNS entraînent des **dommages membranaires** par l'oxydation des lipides insaturés. C'est une réaction en chaîne continuant jusqu'à ce que le substrat soit complétement consommé. Cette peroxydation intervient dans le renouvellement de la membrane cellulaire, mais lors d'un stress oxydatif et nitrique, la peroxydation des lipides altère la structure et la fonction de la membrane, la rendant perméable. Ces dommages membranaires sont dus à l'hydrolyse des phospholipides membranaires par une hydrolase, la Phospholipase A2 (PLA_2), produisant des acides gras libres, (arachidonique (AA) et lysophospholipides) et des ROS (Adibhatla and Hatcher, 2008). Chez le rongeur, l'inhibition de l'activité de la PLA_2 protège des dommages induits par MCAo (Zhang et al., 2012). Chez les patients victimes d'un AVC ischémique, une augmentation de l'activité de la PLA_2 est associée à des déficits neurologiques et des lésions cérébrales plus sévères (Kara et al., 2014). Les produits issus de l'hydrolyse lipidique vont se lier aux lipides et protéines membranaires, provoquant une altération de la fluidité et de la perméabilité membranaires, perturbant l'activité des enzymes membranaires, les liaisons des molécules avec leurs récepteurs membranaires, ou encore les interactions cellulaires (Braughler and Hall, 1989).

Les ROS/RNS entraînent également une **dégradation protéique** (Davies, 1987). En effet, le stress oxydatif entraîne la fragmentation protéique qui est due à l'oxydation du squelette carboné de la chaîne polypeptidique (Berlett and Stadtman, 1997). Certaines modifications consistent en l'oxydation des chaînes latérales des acides aminés avec la

formation de ponts disulfure, de méthionine sulfoxyde (oxydation de l'atome de soufre) et de groupements carbonyles (CO). Les RNS entraînent la formation de dérivés nitrés lors du contact de la tyrosine (nitrotyrosine) avec le NO. Toutes ces modifications post traductionnelles causent des mauvais repliements protéiques et donc l'amorçage des protéines oxydées pour la dégradation par le protéasome (Berlett and Stadtman, 1997; Radak et al., 2011).

Enfin, les ROS/RNS entraînent également des **altérations de l'ADN**, dont les modifications des bases nucléotidiques, la formation de sites apurinique/apyrimidique (sites AP), et la fragmentation de l'ADN simple et double brin. Les modifications directes des nucléotides concernent majoritairement la guanine, car c'est la base la plus sensible aux oxydations en raison de son faible potentiel de réduction (Smith et al., 2013). Le radical hydroxyle (OH) interagit avec différents carbones de la guanine (Cooke et al., 2003). D'ailleurs la production de superoxyde, dans les modèles d'AVC murins, est associée à une augmentation de l'oxydation du 8ème carbone du cycle imidazole de la guanine (8-OxoG) (Lukic-Panin et al., 2010; Nito et al., 2011). Une des conséquences fréquentes de l'oxydation des bases nucléotidiques est la formation des sites AP le long de l'ADN. Ces sites sont des emplacements de l'ADN où la base est manquante. Ce sont donc des sites « vacants ». La présence de 8-OxoG entraîne l'activation du système de réparation par excision de base, ce qui favorise la formation des sites AP. Enfin, le stress oxydatif peut aussi causer la fragmentation de l'ADN simple et double brin. Le radical OH interagit avec le désoxyribose ce qui va générer des radicaux peroxyles (ROO•-). Ces radicaux sont alors responsables des ruptures des liaisons phosphodiester qui forment le squelette de chaque brin d'hélice d'ADN (Dedon, 2008). Ces fragments d'ADN ont été identifiés dans le cortex et l'hippocampe ipsilatéral, après un modèle d'AVC chez le rat (Chen et al., 1997).

Ces radicaux libres activent les métalloprotéases matricielles (MMPs, enzymes protéolytiques possédant un ion Zn^{2+} au niveau de leur site catalytique), qui dégradent le collagène et la laminine constituant la lame basale. Cette dégradation de la matrice extracellulaire perturbe l'intégrité de la paroi vasculaire et augmente la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE).

3. L'altération de la barrière hémato-encéphalique

La **barrière hémato-encéphalique** est une membrane séparant la circulation sanguine et le liquide céphalo-rachidien (LCR), fluide dans lequel baigne le système nerveux central. Elle a pour rôle de protéger le cerveau et la moelle épinière de l'intrusion de composés

potentiellement nocifs, tels que des agents pathogènes, des toxines et certaines hormones, présents dans le sang. La BHE est composée de toute l'unité neuro-glio-vasculaire, c'est à dire de cellules endothéliales, de péricytes, d'astrocytes, de neurones et d'une matrice extracellulaire formant la lame basale (figure 1 et box1) (Hawkins and Davis, 2005).

Les **cellules endothéliales** de la BHE tapissent les micro-vaisseaux cérébraux, et lui confèrent une étanchéité de par leurs jonctions serrées (figure 1). Ces jonctions serrées rendent cette barrière « physique » sélective. De ce fait, les molécules passant la BHE doivent, pour la majorité, passer par la voie trans-cellulaire et donc entraîner un transport actif au niveau des cellules endothéliales (Hawkins and Davis, 2005). C'est ainsi que la BHE filtre et contrôle le passage des substances sanguines et les empêche de passer librement du sang au LCR, seuls les nutriments nécessaires au fonctionnement cérébral traversent ainsi la BHE.

Les **péricytes** sont localisés du coté abluminal (face au parenchyme cérébral) des micro-vaisseaux cérébraux, et jouent un rôle essentiel dans le développement et la maturation de la BHE. Initialement, les péricytes étaient décrits comme étant des cellules contractiles impliquées dans le tonus neurovasculaire (Bandopadhyay et al., 2001). Cependant, de récentes études montrent que ces cellules répondent de manière dynamique à un stress induit par une pathologie cérébrale, telle que l'AVC ischémique, en communiquant chimiquement et physiquement avec les cellules voisines de l'UNV (ElAli et al., 2014).

La **lame basale** entoure (30 à 40 nm d'épaisseur) les cellules endothéliales et les péricytes, et est accolée à la membrane plasmique des pieds astrocytaires. Elle est composée de glycogène (type IV), de laminine, de fibronectine et d'autres protéines de la matrice extracellulaire (MEC) sensibles à la dégradation enzymatique. Les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes expriment à leurs surfaces des molécules d'adhésion leur permettant d'adhérer à la MEC de la lame basale (Hawkins and Davis, 2005). Les **astrocytes**, quant à eux, ont un rôle crucial non seulement dans le support de la BHE mais aussi dans l'interaction neurone/UNV (Khatri et al., 2012).

Suite à un accident ischémique, les processus tels que le déficit énergétique, la diminution de l'activité des Na^+/K^+ ATPases, ou encore la libération du glutamate vont entraîner l'altération de la BHE (Kulik et al., 2008). De nombreuses études, utilisant des modèles *in vitro* de la BHE, indiquent qu'une hypoxie suivie d'une réoxygenation conduit à une augmentation de la perméabilité et/ou à une altération des jonctions serrées de la BHE (Abbruscato and Davis, 1999; Fischer et al., 1999). Le stress hypoxique seul, sans réoxygénation, augmenterait la perméabilité de la BHE *via* un trafic trans-cellulaire (Cipolla

et al., 2004; Plateel et al., 1997). Dans différents modèles animaux, la MCAo transitoire induit une **altération bi-phasique de la BHE** (figure 5) (Belayev et al., 1996; Kuroiwa et al., 1985). La première phase se déroule 2 heures après l'accident ischémique, lors de la désintégration des cellules endothéliales (Hamann et al., 1995), et est rapidement suivie par une augmentation de la perméabilité de la BHE (Belayev et al., 1996). La reperfusion précoce peut atténuer temporairement l'altération de la BHE, mais l'utilisation de la thérapie thrombolytique et une reperfusion retardée peut au contraire aggraver la lésion cérébrale, notamment en entraînant une hémorragie cérébrale (Hjort et al., 2008). La perturbation de la BHE peut résulter de l'accumulation de plusieurs protéines telles que la bradykinine (hormone peptidique vasodilatatrice agissant sur les muscles lisses) (Kamiya et al., 1993), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Abumiya et al., 1999), la thrombine (Okada et al., 1994), les MMPs, et d'autres protéases (Gidday et al., 2005; Rosell et al., 2008). Chez les victimes d'AVC, les niveaux plasmatiques et cérébraux en MMPs sont augmentés (Montaner et al., 2001). Expérimentalement, l'inhibition des MMPs réduit les dommages cérébraux ischémiques (Asahi et al., 2001; Montaner et al., 2001). Le stress oxydatif favorise la lésion de la BHE en déclenchant la libération de la MMP-9, par les neurones, la glie et les cellules endothéliales, qui dégrade la lame basale (Gasche et al., 2001; Heo et al., 1999). Après l'altération précoce de la BHE, une seconde phase de perméabilisation se déroule entre 24 et 72 heures après l'occlusion (Kastrup et al., 1999). Cette phase est plus complexe et entraîne des dommages tissulaires plus importants, notamment par l'infiltration leucocytaire (cf. Chapitre suivant) et la libération de MMP-9 par les neutrophiles qui ont migré dans le parenchyme cérébral (Gidday et al., 2005; Rosell et al., 2008). D'ailleurs, l'inhibition génétique de MMP-9 chez les souris, permet une protection cérébrale contre l'ischémie (Asahi et al., 2001).

L'altération de la BHE permet le passage de molécules sanguines dans le parenchyme cérébral, ce phénomène d'extravasation entraîne une entrée d'eau. Cette entrée d'eau conduit à un **œdème vasogénique**, causant des dommages dits « secondaires » dus à une hypertension intracrânienne. Les lésions cérébrales primaires interviennent lors de l'accident, et résultent de changements cérébraux physiques, alors que les lésions secondaires se produisent progressivement et impliquent un ensemble de processus cellulaires. L'une des causes principales des lésions secondaires est la réponse inflammatoire post-ischémique favorisée par l'altération de la BHE, qui facilite l'infiltration des cellules inflammatoires dans le parenchyme cérébral (del Zoppo and Hallenbeck, 2000).

Box 3. Les cellules inflammatoires impliquées dans la neuroinflammation post-ischémique

La neuroinflammation joue un rôle fondamental dans la physiopathologie de l'AVC. Voici une description très brève des différents acteurs cellulaires importants dans ce phénomène.

Les **leucocytes** sont des globules blancs produits dans la moelle osseuse et présents dans le sang, la lymphe, les organes lymphoïdes (ganglions, rate, amygdale...) et de nombreux tissus conjonctifs de l'organisme, mais pas dans le parenchyme cérébral. Il en existe 3 grands types, les granulocytes (ou polynucléaires), les lymphocytes et les monocytes.

Les **granulocytes** ont été appelés autrefois polynucléaires car ils semblaient posséder plusieurs noyaux. Ce sont des cellules possédant en réalité de gros noyaux polylobés. Ce sont des cellules issues de la différenciation des cellules hématopoïétiques en myéloblastes. Les granulocytes sont classés en 3 catégories : les **neutrophiles**, représentant 65% des leucocytes, sont responsables de la défense contre les infections bactériennes et possèdent une fonction de phagocytose ; les **basophiles** sont responsables des réactions allergiques, en synthétisant l'histamine ; les **éosinophiles** sont responsables de la défense contre les infections parasitaires.

Les **lymphocytes** sont des cellules rondes de faible taille (7 à 8 µm de diamètre) possédant un noyau unique. Ils sont produits dans la moelle osseuse et sont retrouvés dans le sang et les tissus lymphoïdes. Il existe 2 catégories de lymphocytes, qui se différencient uniquement par les récepteurs situés à leur surface. Ce sont les lymphocytes B et T.

Les **lymphocytes B** sont responsables de la production des anticorps et donc impliqués dans l'immunité humorale.

Les **lymphocytes T** sont quant à eux impliqués dans l'immunité à médiation cellulaire.

Les **monocytes** sont les plus gros leucocytes (20à 40µm de diamètre). Ce sont des cellules produites par la moelle osseuse. Ces cellules interviennent dans la phagocytose et dans la coagulation sanguine. Lorsqu'elles quittent la circulation sanguine, ces cellules se différencient en **macrophages** dans le tissu conjonctif, en **microglie** dans le SNC et en ostéoclastes dans l'os.

Toutes ces cellules ont pour fonction de phagocytose et sont attirées vers le site inflammatoire par chimiotactisme. Néanmoins, toute la microglie ne provient pas de la circulation sanguine, la majorité de la microglie est déjà présente dans le parenchyme cérébral.

4. L'inflammation cérébrale post-ischémique

L'inflammation, qui a souvent été considérée comme une simple réaction de défense suite aux lésions tissulaires, est dorénavant reconnue comme un facteur clé dans la physiopathologie des maladies cérébro-vasculaires, en particulier de l'AVC ischémique (Moskowitz et al., 2010). Elle est portée par différents types cellulaires (leucocytes, microglie et astrocytes ; box 3) et coordonnée par des médiateurs spécifiques (cytokines).

a) L'infiltration leucocytaire

La réponse inflammatoire commence dans le compartiment vasculaire immédiatement après l'occlusion artérielle (Carden and Granger, 2000). L'activation des voies de signalisation calcique, le stress oxydatif déclenchent l'expression de nombreux gènes pro-inflammatoires par la synthèse de facteur de transcription, tels que le facteur-KB nucléaire (NFKB, pour *nuclear factor-KB*) (O'Neill and Kaltschmidt, 1997), le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1, pour *Hypoxia Inducible Factor 1*) (Ruscher et al., 1998), et STAT3 (pour *Signal Transduction and Activator of Transcription-3*) (Planas et al., 1996). Les médiateurs inflammatoires, tels que le facteur de nécrose tumorale (TNF-α), les interleukines 1β et 6 (IL-1β et IL-6) sont produits par les cellules cérébrales lésées. Ces trois médiateurs ont été décrits comme étant délétères dans les modèles d'ischémie expérimentale, et leurs niveaux augmentent dans le fluide cérébrospinal et dans le sang des patients victimes d'AVC ischémique (Allan et al., 2005; McCoy and Tansey, 2008; Simi et al., 2007; Whiteley et al., 2009). Suite à l'expression de ces médiateurs pro-inflammatoires, les cellules endothéliales s'activent et expriment, à leur surface, des molécules d'adhésion (Gong et al., 1998; Lindsberg et al., 1991; Pirttila and Kauppinen, 1992; Zhang et al., 1998b). Trois groupes de molécules d'adhésion sont surexprimés : les sélectines (principalement les E- et P-sélectines), les immunoglobulines (principalement ICAM-1 pour *InterCellular Adhesion Molecule*) et les intégrines (CD11b et CD18) (Lindsberg et al., 1996; Zhang et al., 1998a). Chez l'animal, l'inhibition de ces molécules d'adhésion a un effet neuroprotecteur, après une ischémie (Denes et al., 2010; Mocco et al., 2002; Suzuki et al., 1999a).

Ces molécules d'adhésion interagissent avec les récepteurs de surface des neutrophiles. Les neutrophiles (box 3) sont des cellules leucocytaires du système immunitaire inné pouvant phagocyter des cellules et sécréter des médiateurs inflammatoires. Le recrutement de ces cellules immunitaires dans le cerveau ischémié commence par un « roulement » de ces neutrophiles sur les cellules endothéliales activées, processus nécessitant

les sélectines. Ce phénomène se produit entre 4 et 6 heures après l'occlusion (figure 8). Les neutrophiles vont ensuite s'activer et s'adhérer aux cellules endothéliales, par l'intermédiaire des intégrines et des immunoglobulines. Une fois adhérés à l'endothélium, les neutrophiles vont traverser le mur vasculaire et entrer dans le parenchyme cérébral, phénomène de diapédèse facilité par l'altération de la BHE (figure 8) (Yilmaz and Granger, 2010). Les neutrophiles sont les premières cellules sanguines présentent dans l'aire ischémiée. Leur nombre atteint un pic entre 2 et 4 jours après l'occlusion, pour ensuite diminuer au fil du temps (Garcia-Bonilla et al., 2014; Gelderblom et al., 2009). Chez l'animal, l'inhibition de l'infiltration leucocytaire diminue significativement la taille de la lésion cérébrale et améliore le pronostic fonctionnel (Barone and Feuerstein, 1999). De plus, le recrutement des neutrophiles peut entraîner l'obstruction de la microcirculation, empêchant ainsi la reperfusion sanguine aggravant le degré de l'ischémie (del Zoppo et al., 1991; Huang et al., 2006).

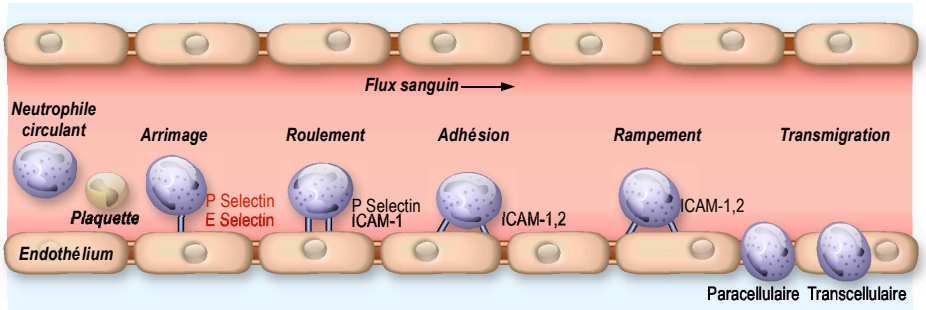


Figure 8 : Processus d'infiltration des neutrophiles dans le parenchyme cérébral.

Une fois dans le parenchyme cérébral, les neutrophiles vont libérer des ROS et des enzymes protéolytiques, entraînant des dommages tissulaires. Que ce soit chez l'Homme ou dans des modèles expérimentaux, l'infiltration des neutrophiles est associée à une augmentation de l'expression de différentes enzymes telles que la forme inductible de l'oxyde nitrate synthase (iNOS), COX-2 ou encore MMP-9.

L'**iNOS** produit une quantité toxique de NO (Forster et al., 1999). L'effet délétère du NO produit par l'iNOS a été mis en évidence par l'inhibition pharmacologique de l'iNOS ou par l'invalidation du gène codant pour cette enzyme chez la souris. En effet, la diminution de la synthèse de NO permet de réduire l'infarctus cérébral (Iadecola, 1997; Iadecola et al., 1997). La **COX-2** produit l'ion superoxyde (O_2^-) et les prostaglandines (métabolites de l'AA). La COX-2 est surexprimée dans la pénombre, *via* les neutrophiles, les cellules endothéliales et les neurones (Bidmon et al., 2000; Iadecola et al., 1999). Tout comme l'inhibition de l'iNOS, l'inhibition sélective de la COX-2 est bénéfique dans un modèle murin d'ischémie

(Iadecola et al., 2001; Nagayama et al., 1999). L'infiltration dans le parenchyme cérébral des neutrophiles induit aussi la libération, par dégranulation, et l'activation de MMPs, et plus particulièrement celle de **MMP-9**. Une fois activée, MMP-9 amplifie la réponse inflammatoire cérébrale en activant des cellules immunitaires résidentes, et en favorisant l'infiltration leucocytaire, ce qui altère d'autant plus la BHE (Amantea et al., 2009). Une réduction de l'infarctus cérébral est observée après une inhibition génétique ou pharmacologique de MMP-9 (Asahi et al., 2000).

Les neutrophiles ne sont pas les seuls leucocytes à traverser la BHE. En effet, les monocytes (box 3) vont migrer dans le parenchyme cérébral, pour devenir les cellules prédominantes sept jours après l'ischémie (Iadecola, 1997). D'ailleurs, l'inflammation cérébrale induite par l'ischémie est associée à l'activation de différentes populations cellulaires, telles que les microglies/macrophages et les astrocytes.

b) L'activation de la microglie

La **microglie** (box 3) est une population cellulaire de la glie, au même titre que les cellules macrogliales (oligodendrocytes, cellules de Schwann, astrocytes, et épendymocytes), mais se différencie par sa morphologie, sa fonction et son origine.

La microglie est issue du mésoderme tout comme les macrophages (Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012), contrairement à la macroglie, d'origine neuroectodermale. Les cellules microgliales sont des macrophages résidents du cerveau et de la moelle épinière. Représentant jusqu'à 25 % des cellules du SNC, ces cellules produisent des cytokines, des radicaux libres et des protéines, dans le but d'assurer la défense immunitaire. En condition physiologique, la microglie est maintenue activement dans un état quiescent, et arbore des ramifications, ce qui la rend morphologiquement distincte des macrophages (figure 9) (Nimmerjahn et al., 2005). La microglie se distingue des monocytes par leur niveau d'expression de l'antigène CD45 (antigène leucocytaire commun). En effet la microglie est positive au CD11b et exprime faiblement CD45 ($CD11b^{+}/CD45^{faible}$), alors que les monocytes sont $CD11b^{+}/CD45^{fort}$ (Ford et al., 1995).

L'infiltration leucocytaire et l'activation de la microglie sont les premières étapes du processus inflammatoire post-ischémique. Une fois activée, la microglie devient une cellule phagocytaire et adopte une morphologie amiboïde (Patel et al., 2013), rendant difficilement la distinction entre la microglie et les macrophages (figure 9). La microglie activée est caractérisée par la présence de différents antigènes : CD11b, IB4 (*Isolectin B-4*), Iba-1

(*ionized calcium-binding adapter molecule 1*), F4/80 ou encore ED-1 (ou CD68 ; ED-1 chez le rongeur et CD68 chez l'humain), tous exprimés également par les macrophages (Ginhoux et al., 2010; Taylor and Sansing, 2013).

L'activation microgliale intervient dans les premières minutes qui suivent l'occlusion (Denes et al., 2007). Trois jours après l'ischémie, l'activation et l'amplification de la microglie atteint un pic et continue pendant plusieurs semaines (Lalancette-Hebert et al., 2007). La microglie prolifère uniquement dans l'hémisphère ipsilatéral (côté lésé) (Campanella et al., 2002). Dans cet environnement ischémique, en plus de phagocyter les débris cellulaires, la microglie sécrète des cytokines pro-inflammatoires, des ROS et des MMPs, lui conférant un rôle néfaste (Gregersen et al., 2000; Iadecola and Anrather, 2011). Celui-ci est confirmé par l'effet délétère de l'application directe de la microglie sur des cultures neuronales, dans différents modèles mimant l'ischémie *in vitro* (Giulian et al., 1993; Lehnardt et al., 2003; Zhang et al., 1997). En conséquence, de nombreux traitements expérimentaux visent à réduire l'activation et/ou la prolifération microgliale (Gunther et al., 2005; Yrjanheikki et al., 1998; Yrjanheikki et al., 1999; Zhang et al., 2005).

Cependant, la microglie et/ou les facteurs qu'elle sécrète, comme les médiateurs anti-inflammatoires (Ponomarev et al., 2013), pourraient être bénéfiques (Watanabe et al., 2000). D'ailleurs, certaines études montrent que l'altération de l'activation et/ou de la prolifération de la microglie augmente significativement la taille de la lésion, ainsi que le nombre de neurones apoptotiques après une ischémie (Lalancette-Hebert et al., 2012). Cela soutient l'idée d'un **rôle ambivalent de la microglie** après un AVC ischémique.

Cette ambivalence s'explique par le fait qu'une fois activée, la microglie peut présenter un **phénotype M1 dit classique**, ou alors un **phénotype alternatif, M2** (figure 10), tout comme les macrophages (Michelucci et al., 2009). La microglie de type M1 est décrite pour être pro-inflammatoire car elle sécrète de nombreux médiateurs pro-inflammatoires, tels que le TNF-α, l'IL-1β, l'interféron-γ (INF-γ), iNOS, et MCP-1 (CCL-2). Elle exprime CD80, CD86 et le complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH-II) à sa surface, permettant de présenter les antigènes aux lymphocytes T (box3 et figure 10) (Ransohoff and Brown, 2012; Starossom et al., 2012). La microglie de type M1, le phénotype le plus observé après l'ischémie, aurait davantage tendance à induire la mort neuronale que la microglie de type M2 (Hu et al., 2012). La microglie de type M2 serait quant à elle bénéfique, et donc impliquée dans la neuroprotection et la réparation des lésions cérébrales (Kawanokuchi et al., 2008; Starossom et al., 2012). La microglie de type M2 sécrète des médiateurs anti-inflammatoires

tels que les IL-10, IL-4, IL-13, le facteur de croissance transformant β (TGF-β, pour *Transforming Growth Factor-β*), le facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (IGF-1, pour *Insulin Growth Factor-1*), ou encore différents facteurs neurotrophiques (Hanisch and Kettenmann, 2007; Liu et al., 2012; Ponomarev et al., 2013; Shin et al., 2004; Taylor and Sansing, 2013; Zhou et al., 2012). Dans l'AVC ischémique, le phénotype M2, de la microglie et des macrophages recrutés, est dominant dans les premiers temps. Le phénotype M1 augmente progressivement au cours du temps pour devenir prédominant, et plus particulièrement dans la pénombre ischémique (Hu et al., 2012). En prenant en compte les rôles opposés de la microglie, les stratégies thérapeutiques ne devraient donc pas simplement se résumer à l'inhibition ou la suppression de la microglie, mais plutôt à favoriser la différenciation du phénotype bénéfique (Hu et al., 2012).

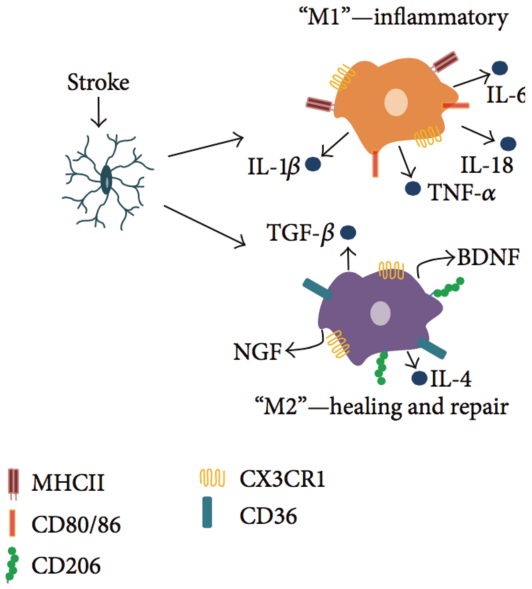


Figure 9: La polarisation de la microglie est caractérisée par des phénotypes distincts. D'après (Taylor and Sansing, 2013).

Les astrocytes participent également aux dommages dits « secondaires ».

c) L'activation astrocytaire

Les **astrocytes** (box 1) sont des cellules « étoilées », d'apparence touffue, de par leurs fines ramifications. Les **astrocytes** qui ont longtemps été décrits comme des cellules de maintien, participent aussi à la transmission nerveuse. Ils recapturent des neurotransmetteurs, tel que le glutamate, au niveau synaptique, jouant ainsi un rôle dans la clairance du glutamate potentiellement toxique (Anderson and Swanson, 2000).

Les astrocytes sont aussi des cellules sensibles à la privation d'oxygène (O_2) et de glucose. À la suite d'un AVC, leurs processus cellulaires s'hypertrophient, et ces astrocytes

surexpriment la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP, pour *Glial Fribillary Acidic Protein*). Ce phénomène est l'activation astrocytaire et cela entraîne la gliose (ou prolifération des cellules gliale) et leurs modifications fonctionnelles et structurelles (Pekny and Nilsson, 2005). *In vitro,* la privation d' O_2 et de glucose (OGD, pour *Oxygen Glucose Deprivation,* un modèle d'ischémie *in vitro*) altère l'expression et l'activité des transporteurs du glutamate, la recapture du glutamate, et réduit l'expression intracellulaire du glutathion des astrocytes matures (Gouix et al., 2014). Cela potentialise les mécanismes d'excitotoxicité et de stress oxydatif post-ischémiques.

De plus, les astrocytes participent aussi à la réponse inflammatoire dans le cas de lésions cérébrales, en exprimant différents médiateurs inflammatoires (Benveniste, 1998; Che et al., 2001). Dans différents modèles d'ischémie, les astrocytes expriment à leurs surfaces les CMH de classe I et II, leur permettant d'induire une réponse immune impliquant les lymphocytes Th2 (production d'anticorps anti-inflammatoire) et d'inhiber l'expression d'IL-12 (cytokine pro-inflammatoire) (Dong and Benveniste, 2001). Les astrocytes sont également capables de sécréter des médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines et l'iNOS (Dong and Benveniste, 2001). Après 10 minutes d'ischémie globale transitoire (box 2), les astrocytes activés dans l'hippocampe ipsilatéral expriment iNOS (Endoh et al., 1994), dont le rôle délétère pour les neurones est décrit (Hewett et al., 1996). Enfin, les astrocytes sont capables, au même titre que les neurones et les cellules endothéliales, de produire des protéines apoptotiques de la famille du TNF (Yepes et al., 2005). Cette protéine peut stimuler la production de molécules pro-inflammatoires en interagissant avec son récepteur se trouvant sur les astrocytes (Saas et al., 2000). D'ailleurs, l'inhibition de l'expression et/ou la fonction de cette protéine permet de réduire le volume de l'infarctus cérébral chez la souris (Yepes et al., 2005). Ces données soulignent l'important rôle des astrocytes activés dans la physiopathologie de l'AVC.

L'inflammation cérébrale induite par l'ischémie est donc associée à l'activation de différentes populations cellulaires résidentes, telles que les cellules endothéliales, les microglies/macrophages et les astrocytes. Cette activation conduit à la synthèse, l'expression et/ou la sécrétion de différentes protéines inflammatoires. Celles-ci vont attirer et activer les leucocytes, qui vont à leur tour apporter leurs propres médiateurs inflammatoires et facteurs cytotoxiques qui vont amplifier la réponse inflammatoire, et entraîner les dommages dit « secondaires ». Ces médiateurs inflammatoires sont les **cytokines** et les **chimiokines**.

d) Les médiateurs de la réponse inflammatoire : les cytokines

Les **cytokines** sont des protéines impliquées dans la communication intercellulaire dans la réponse immunitaire et stimulent le déplacement de certaines cellules (les leucocytes, par exemple) vers les sites d'inflammation ou d'infection. Les cytokines peuvent être synthétisées par plusieurs types de cellules et agir sur un grand nombre de cellules cibles sur lesquelles elles auront des actions variées. Les cytokines agissent selon différents modes d'action : autocrine, juxtacrine, paracrine et endocrine. Les cytokines agissent par l'intermédiaire de récepteurs présents sur les cellules cibles. La plupart de ces récepteurs n'ont pas d'activité enzymatique propre et sont associés à d'autres protéines cellulaires. Il existe une centaine de cytokines, classées suivant leur homologie de structure.

Après une ischémie cérébrale, les cytokines les plus décrites pour être surexprimées sont le TNF-α, les interleukines, les interférons et les chimiokines.

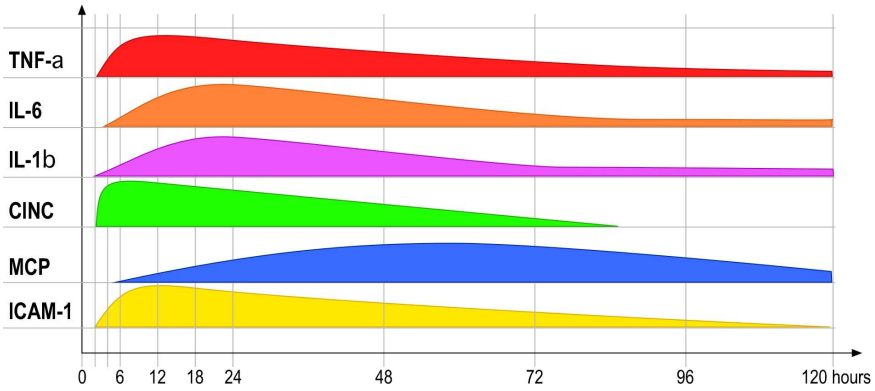


Figure 10 : Représentation en diagramme de la cinétique d'expression des différentes cytokines dans le cerveau des rongeurs après une ischémie cérébrale, d'après (Nilupul Perera et al., 2006).

Le **TNF-α** est surexprimé dans le cerveau après une ischémie (Huang et al., 2006). La microglie est la principale source de TNF-α dans un cerveau ischémié de souris (Gregersen et al., 2000). L'expression de TNF-α est initialement neuronale (Liu et al., 1994), puis elle est observée plus tard dans la microglie et les astrocytes (Uno et al., 1997), et même dans le système immunitaire périphérique (Offner et al., 2006). Une première vague de surexpression est observée entre 1 et 3 heures après l'occlusion (Liu et al., 1994), et un second pic se produit entre 24 et 36 heures (Murakami et al., 2005; Offner et al., 2006) (figure 10). Les données obtenues expérimentalement et chez l'Homme indiquent que TNF-α est impliqué dans l'extension des dommages cérébraux induit par une ischémie. Son niveau d'expression dans le liquide cérébrospinal est significativement augmenté dans les 24 heures après l'AVC et est,

dans le sérum, positivement corrélé à la taille de la lésion cérébrale (Zaremba et al., 2001). Le TNF-α induit l'expression des molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales et favorise l'accumulation et l'infiltration leucocytaire, perturbe la BHE et stimule l'induction d'autres médiateurs inflammatoires (Hallenbeck, 2002). Le rôle du TNF-α a très longtemps été associé à une exacerbation de la lésion cérébrale induite par l'AVC. En effet, plusieurs études expérimentales ont montré un effet délétère du TNF-α. Chez le rat, la surexpression de TNF-α augmente la taille de l'infarctus, 24 heures et 7 jours après une ischémie cérébrale (Pettigrew et al., 2008). A l'inverse, l'administration d'un anticorps neutralisant le TNF-α réduit la lésion cérébrale après une ischémie, chez le rat et la souris (Nawashiro et al., 1997; Yang et al., 1998). Cependant, d'autres études suggèrent que TNF-α pourrait avoir un effet neuroprotecteur. Dans un modèle de souris n'exprimant pas les deux récepteurs du TNF-α (TNFR1 et TNFR2), la MCAo (box 2) induit une lésion cérébrale moins importante comparée à celle des souris sauvages (Bruce et al., 1996). Ces résultats contradictoires sont dus à l'existence de deux récepteurs du TNF-α. Le TNFR1 a été décrit comme ayant un rôle dans la mort cellulaire et plus particulièrement dans l'apoptose, alors que le TNFR2 semble plutôt avoir un rôle dans la survie cellulaire (Hallenbeck, 2002).

Les **interleukines** jouent aussi un rôle important dans la physiopathologie de l'AVC, notamment deux d'entre elles : **IL-1β** et **IL-6**. Tout comme le TNF-α, l'expression d'IL-1β et d'IL-6 est drastiquement amplifiée après une ischémie transitoire ou permanente. Le TNF-α et l'IL-1β sont produits par la microglie, les macrophages infiltrés, les macrophages provenant des monocytes, les astrocytes et les neurones (Buttini et al., 1994; Clausen et al., 2008; Davies et al., 1999; Lambertsen et al., 2005), alors que l'IL-6 est produit par les neurones (Suzuki et al., 1999b; Suzuki et al., 2009).

L'expression génique de l'**IL-1β** est significativement augmentée après une ischémie cérébrale chez le rat (Buttini et al., 1994; Liu et al., 1993). Une augmentation du niveau protéique est également retrouvée après une MCAo (Davies et al., 1999), avec un pic dans les heures suivant la reperfusion, chez les rongeurs (figure 11) (Hara et al., 1997). L'IL-1β participe aux mécanismes délétères cités précédemment, à savoir, l'excitotoxicité, l'inflammation (libération d'AA), le stress oxydatif (synthèse du NO) et l'invasion leucocytaire (Huang et al., 2006). L'effet délétère d'IL-1β a été révélé par l'administration d'un antagoniste du récepteur d'IL-1, cette administration réduisant la sévérité des dommages

ischémiques, chez le rat (Garcia et al., 1995), mais aussi chez l'Homme (Emsley et al., 2005). De plus, la réduction de l'expression d'IL-1β, par l'inhibition de l'enzyme responsable de sa formation, réduit les dommages ischémiques (Hara et al., 1997). Inversement, chez le rongeur, l'injection intracérébroventiculaire (*icv*) d'IL-1β, après la MCAo, augmente l'œdème et la lésion cérébrale, ainsi que l'infiltration des neutrophiles dans le parenchyme cérébral (Huang et al., 2006; Yamasaki et al., 1995b; Yamasaki et al., 1994).

L'expression d'**IL-6** est significativement augmentée dans la phase aiguë de l'ischémie cérébrale (Berti et al., 2002). En effet, l'expression génique de cette cytokine est augmentée dans les 3 heures suivant l'occlusion avec un pic à 12 heures (Wang et al., 1995), et reste élevée dans les neurones et la microglie de la pénombre ischémique jusqu'au 14ème jour après l'occlusion (Suzuki et al., 1999b) (figure 11). Chez les patients victimes d'AVC ischémique, la concentration en IL-6 dans le plasma est associée à la sévérité de l'AVC ainsi qu'au mauvais pronostic clinique (Orion et al., 2008). D'ailleurs l'administration d'un antagoniste du récepteur d'IL-1 améliore le pronostic clinique et réduit la concentration sanguine d'IL-6, dans un essai clinique (Emsley et al., 2005). Cependant, ces résultats sont contradictoires avec les données précliniques, suggérant que l'IL-6 aurait un rôle neuroprotecteur durant l'AVC. En effet, l'injection en *icv* d'IL-6 réduit les dommages cérébraux ischémiques chez le rat (Loddick et al., 1998). De plus, l'augmentation du niveau endogène de cette cytokine prévient les dommages neuronaux en réduisant la cascade de signalisation apoptotique (Yamashita et al., 2005). Il est donc difficile de savoir si l'effet global d'IL-6 est bénéfique ou néfaste dans le contexte de l'AVC.

D'autres cytokines jouent un rôle crucial dans la physiopathologie de l'AVC, ce sont les **chimiokines** (Le Thuc et al., 2015). C'est une famille de petites protéines ayant un rôle dans la communication cellulaire, et plus particulièrement dans la migration de cellules inflammatoires vers le site d'inflammation. Les chimiokines agissent sur leurs récepteurs couplés à une protéine G, et peuvent être classées en quatre groupes : C, CC, CXC, et CX3C selon l'espacement entre deux de leurs cystéines en position N-terminal (figure 11) (Charo and Ransohoff, 2006). Et lors d'une ischémie cérébrale, certaines chimiokines voient leurs expressions génique et protéique augmentées, notamment la **fractalkine** (ou CX3CL1), la **CICN** (pour « *cytokine-induced neutrophil chemoattractant* » ou CXCL-8, IL-8), ou encore **MCP-1** (pour « *Monocyte chemoattractant protein-1* » ou CCL-2).

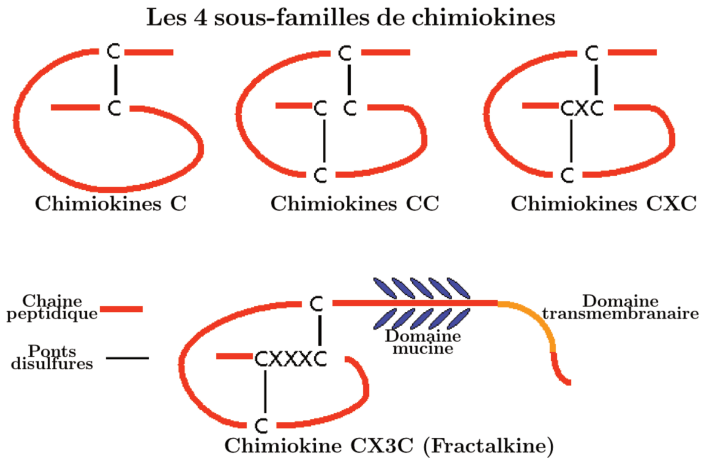


Figure 11 : Schéma représentant les 4 sous-familles de chimiokines, d'après Kohidai, L. (2008).

La **fractalkine** (ou CX3CL1) est une chimiokine exprimée par les neurones qui agit par l'intermédiaire de son récepteur CX3CR1, un récepteur couplé à une protéine G, qui se trouve majoritairement sur les cellules microgliales (Harrison et al., 1998). Expérimentalement, il a été montré que l'expression de la fractalkine est augmentée dans les neurones du cortex ipsilatéral, avec un pic à 48 heures, puis revient à son niveau basal 7 jours après l'ischémie (Ahmad and Graham, 2010). De plus, l'expression du récepteur de la fractalkine, CX3CR1, est détectée sur la microglie activée entre 24 et 48 heures après l'ischémie, et devient plus importante 7 jours après. Ceci suggère que la fractalkine pourrait participer à l'activation et la chimio-attraction de la microglie dans le tissus ischémié, et pourrait aussi contribuer au contrôle de l'infiltration leucocytaire dans le parenchyme cérébral (Tarozzo et al., 2002). L'effet délétère de cette chimiokine a été mise en évidence par Soriano et ses collaborateurs. En effet, leurs souris déficientes en fractalkine ont des lésions cérébrales et une mortalité réduite après une ischémie (Soriano et al., 2002).

L'expression des ARNm d'**IL-8** et de **CCL2** est augmentée dans le cerveau des rats, dans les 6 premières heures suivant une MCAo permanente. Cette expression atteint un maximum à 12 heures puis diminue à partir de 24 heures (Minami and Satoh, 2003) (figure 11). L'IL-8 et CCL2 sont impliquées dans l'infiltration leucocytaire après une ischémie (Ivacko et al., 1997; Yamasaki et al., 1995a). Dans des modèles expérimentaux d'AVC, l'expression cérébrale de ces chimiokines est augmentée avant l'infiltration des neutrophiles dans le parenchyme (Huang et al., 2006), et l'inhibition pharmacologique de l'activité d'IL-8 réduit la taille de la lésion cérébrale (Yamasaki et al., 1997). Chez l'Homme, de nombreuses

études montrent une augmentation de la concentration en CCL2 dans le sérum des patients victimes d'AVC (Garlichs et al., 2003; Sanchez-Moreno et al., 2004). Chez le rongeur, l'expression génique et protéique de CCL2 est augmentée dans le cortex ischémié transitoirement ou de façon permanente (Che et al., 2001; Kim et al., 1995; Wang and Feuerstein, 1995). L'administration de CCL2 augmente significativement la perméabilité de la BHE *in vivo* et *in vitro* (Stamatovic et al., 2005). Sa surexpression amplifie la lésion cérébrale et l'infiltration des monocytes et des macrophages (Chen et al., 2003a). À l'inverse, l'inhibition ou encore la déficience de cette chimiokine est associée à une réduction des dommages cérébraux. En effet, la déficience génétique de CCL2 est protectrice dans un modèle murin d'AVC (Hughes et al., 2002). Cette protection est retrouvée lorsque le récepteur de cette chimiokine (CCR2) n'est plus exprimé (Dimitrijevic et al., 2007). Néanmoins, son rôle est encore controversé, puisque Gidday et ses collaborateurs montrent l'implication de CCL2 dans la protection contre l'AVC, dans des modèles *in vivo* et *in vitro* (Stowe et al., 2012; Wacker et al., 2012).

Cet aperçu de l'interaction complexe entre le système immunitaire et le système nerveux, dans le cadre de l'AVC, montre qu'il est difficile de développer une stratégie thérapeutique ciblant uniquement une protéine ou son récepteur, ou encore une population cellulaire. De plus, la réponse inflammatoire post-ischémique est associée à la mort cellulaire, et plus particulièrement à l'apoptose. Globalement, après un accident ischémique, les cellules cérébrales soumises aux différents mécanismes décrits précédemment, peuvent mourir par différents processus de mort cellulaire.

5. La mort cellulaire induite par l'ischémie cérébrale

Chronologiquement, l'ischémie cérébrale induit tout d'abord la nécrose puis l'apoptose, en fonction de la concentration intracellulaire en ATP. En effet, une déficience en ATP favorise la nécrose et inversement pour l'apoptose (Leist et al., 1997). La nécrose est le mécanisme prédominant suite à l'occlusion permanente d'une artère cérébrale, alors que durant une ischémie transitoire et donc moins sévère, l'apoptose est révélée et a lieu en particulier dans la pénombre ischémique (Dirnagl et al., 1999). Ainsi plusieurs facteurs, tels que le degré de l'ischémie, la maturité cellulaire, la concentration calcique intracellulaire et le microenvironnement cellulaire, déterminent quel processus de mort cellulaire prédominera (Choi, 1995; Lee et al., 1999; Leist and Nicotera, 1998).

La **nécrose** résulte généralement d'une déficience énergétique, due à une rapide pénurie en ATP, menant à la perte de l'intégrité des membranes cellulaires. Ainsi, la libération des enzymes de dégradation entraîne la destruction de la cellule (Zong and Thompson, 2006). Les ROS, le Ca^{2+}, ou encore la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) peuvent induire la nécrose (Hotchkiss et al., 2009). PARP est une enzyme de réparation de l'ADN. Cette enzyme participe à la pénurie en ATP, en tentant de réparer les multiples lésions d'ADN se produisant lors de l'ischémie. L'inhibition de PARP réduit la nécrose suite à une ischémie (Jagtap and Szabo, 2005). Les cellules mourant par nécrose libèrent davantage de glutamate et de toxines dans leur environnement, affectant les neurones aux alentours, entraînant donc un cercle vicieux.

Contrairement à la nécrose, **l'apoptose** correspond à une mort cellulaire programmée, autrement dit selon un programme génétique établi. Elle se caractérise au niveau cellulaire par une condensation de l'ADN et par l'invagination de la membrane plasmique qui est préservée jusqu'à la fin du processus, ce qui minimise l'inflammation et la libération du matériel génétique (Choi, 1996; Lee et al., 1999; Namura et al., 1998). La principale caractéristique de l'apoptose est le clivage des protéines du cytosquelette par des protéases à cystéine, les caspases, provoquant ainsi la destruction des composés intracellulaires (Marsden and Strasser, 2003; Strasser, 2005). L'activation des récepteurs au glutamate (Namura et al., 1998), la production des ROS (Dugan et al., 1995), la diminution du K^+ (Yu et al., 1997), et l'entrée du Zn^{2+} dans la cellule, sont des facteurs déclenchant l'apoptose. Des études post-mortem chez des victimes d'AVC ont montré une augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques dans le tissu cérébral ischémié, et plus particulièrement dans la pénombre (Mitsios et al., 2007; Sairanen et al., 2006). Les études expérimentales montrent que les neurones et la glie peuvent mourir par apoptose suite à un accident ischémique. En effet, les gènes codant pour les caspases, et pour les protéines inhibant (Bcl-2 et Iap) et favorisant (Bax et Trp53) la mort cellulaire, sont fortement exprimés durant l'ischémie. L'inhibition génétique ou pharmacologique des caspases (Thornberry and Lazebnik, 1998), ou l'activation de Bcl-2 (Adams and Cory, 1998), confèrent une résistance face à l'ischémie. Après une MCAo de 30 min, la libération du cytochrome C et l'activation des caspases sont détectées à 6h et 9h, respectivement, et la mort cellulaire devient importante entre 24 et 72 heures (Dirnagl et al., 1999). Les caspases activées sont des enzymes clivant plus d'une trentaine de protéines, modifiant de manière cruciale l'homéostasie cellulaire, et entraînant la mort cellulaire. Des quinze caspases identifiées à ce jour, les caspases 1 et 3 jouent un rôle majeur dans l'apoptose

suite à une ischémie (Namura et al., 1998). La réponse apoptotique est initiée par la libération du cytochrome C mitochondrial, en activant le complexe de l'apoptosome en présence d'ATP (Green and Reed, 1998), d'où l'importance de la présence d'ATP pour favoriser l'apoptose à la nécrose. Cette activation du complexe de l'apoptosome permet le clivage et l'activation des caspases (Green and Reed, 1998). L'activité des caspases peut être inhibée *in vivo* et *in vitro* par l'administration de petits peptides qui se fixent de manière covalente et irréversible sur leurs sites catalytiques (Nicholson and Thornberry, 1997). Ces inhibiteurs permettent d'atténuer la lésion cérébrale, dans un modèle d'ischémie focale, mais aussi de réduire les déficits neurologiques associés (Hara et al., 1997). Contrairement, aux antagonistes des récepteurs NMDA, les inhibiteurs de caspases réduisent le volume lésionnel plusieurs heures après une ischémie cérébrale modérée (Fink et al., 1998a). L'injection en *icv* d'un inhibiteur de caspase 3, dans les 9 heures après une MCAo de 30 min, est neuroprotectrice (Fink et al., 1998a). Toutes ces données suggèrent qu'une réduction de l'apoptose par l'inhibition des caspases aurait un potentiel thérapeutique dans le cadre de l'AVC.

Face à toute cette cascade d'évènements délétères déclenchée par l'ischémie cérébrale, de nombreux mécanismes endogènes de protection sont mis en place par le cerveau pour tenter de limiter la lésion cérébrale et/ou de récupérer.

E. Les mécanismes de protection endogène du cerveau contre l'AVC

Le cerveau dispose de mécanismes protecteurs pour tenter de diminuer les dégâts d'une ischémie cérébrale et rétablir l'homéostasie. Ces mécanismes neuroprotecteurs interviennent aux niveaux vasculaire, cellulaire et moléculaire. Suite à un AVC ischémique, la pression artérielle des patients est augmentée par l'activation de leur système nerveux sympathique et la libération d'hormones (Johansson et al., 2000). Cela favorise la perfusion du tissu ischémié, au travers de vaisseaux sanguins collatéraux, provenant de territoires voisins qui sont perfusés normalement (Liebeskind, 2010). L'arrivée de sang vers la zone infarcie est aussi facilitée par la libération locale de vasodilatateurs, tels que l'adénosine, des ions vaso-actifs (K^+ et H^+) et le NO.

Pendant l'hypoxie, la dégradation d'HIF-1 est réduite pour favoriser l'apport en oxygène et en glucose. La suppression de l'activité neuronale et de la synthèse protéique réduit l'impact du déficit énergétique causé par l'ischémie (Dirnagl et al., 2003; Paschen, 2003). La suppression de l'activité neuronale est réalisée par la désensibilisation des récepteurs au NMDA et à l'inhibition de l'activité synaptique. La suppression de la synthèse

protéique est provoquée par le dysfonctionnement du réticulum endoplasmique. En parallèle, les facteurs anti-apoptotiques, tels que Bcl-2, mais aussi les protéines de choc thermique (HSP, pour *Heat Shok Protein*) sont surexprimées pour réduire l'apoptose.

Cependant, certains de ces processus, en apparence protecteurs, peuvent être également néfastes. En effet, il existe une certaine limite au-delà de laquelle ces processus deviennent délétères. Par exemple, l'élévation excessive de la pression artérielle peut entraîner des hémorragies cérébrales et exacerber l'œdème cérébral, alors qu'une immunosuppression post-ischémique est associée à des infections systémiques potentiellement mortelles (Iadecola and Anrather, 2011). **L'inflammation cérébrale post-ischémique** a un rôle ambivalent, car elle n'est pas seulement la cause de dommages secondaires, elle est aussi importante dans le remodelage et la récupération cérébrale.

1. Le rôle « bénéfique » de l'inflammation cérébrale post-AVC

Les facteurs provoquant la résolution de l'inflammation et le rétablissement de l'homéostasie cérébrale sont encore méconnus. De nombreux arguments suggèrent que la résorption de l'inflammation n'est pas un processus passif, simplement dû à l'extinction de la signalisation, mais au contraire serait orchestré par l'interaction d'un grand nombre de médiateurs pour supprimer la réponse inflammatoire (Spite and Serhan, 2010). Les étapes principales dans ce processus sont l'élimination des cellules mortes, la formation d'un milieu anti-inflammatoire et la génération de facteurs favorisant la reconstruction et la guérison du tissu cérébral (Spite and Serhan, 2010).

La microglie et les macrophages infiltrés dans le parenchyme, constituent les principaux phagocytes, permettant d'éliminer les cellules mortes et les débris cellulaires après l'AVC (Denes et al., 2007). Ce processus est dirigé par des signaux moléculaires nommés « trouve-moi » et « mange-moi ». Les signaux « trouve-moi » sont des purines (molécules azotées) libérées par les cellules lésées et des chimiokines, attirant la microglie et les macrophages vers la lésion (Davalos et al., 2005). Les signaux « mange-moi » permettent la phagocytose des cellules mourantes et mortes.

La formation d'un milieu anti-inflammatoire passe principalement par les cytokines, TGF-β et IL-10. La production de ces cytokines est favorisée par la phagocytose et intervient durant l'élimination des cellules mortes (Nathan and Ding, 2010). Le TGF-β, surexprimé après une ischémie par la microglie et les macrophages, possède des propriétés neuroprotectrices. Bien que ses effets pro-inflammatoires soient établis, le TGF-β peut également supprimer la réponse inflammatoire en inhibant les réponses cellulaires des

lymphocytes Th1 et Th2 (médiateurs de la réponse pro-inflammatoire) et en favorisant celle des lymphocytes T régulateurs (suppresseurs de la réponse pro-inflammatoire) (Taylor et al., 2006). L'IL-10 est quant à elle produite par de nombreuses cellules, dont les lymphocytes T régulateurs (Liesz et al., 2009), et possède des propriétés neuroprotectives et anti-inflammatoires. En effet, dans différents modèles d'ischémie cérébrale, la surexpression cérébrale d'IL-10 réduit la taille de la lésion et les dommages hippocampiques. Ainsi, la production post-ischémique de TGF-β et d'IL-10 peut faciliter la « réparation » tissulaire en favorisant la résorption de l'inflammation et en exerçant des effets protecteurs sur les cellules survivant dans le territoire ischémique.

Après une ischémie, le cerveau produit des facteurs de croissance pour établir un environnement favorable à la neurogenèse, l'angiogenèse, la gliogenèse et la réorganisation des matrices extracellulaires (Greenberg and Jin, 2006). Les facteurs de croissance sont généralement définis comme étant des protéines nécessaires à la prolifération et à la différenciation des cellules. Les cellules inflammatoires, les neurones et les astrocytes sont capables de produire une multitude de facteurs de croissance. Par exemple, les cellules microgliales expriment l'IGF-1, qui est un facteur clé dans la croissance neuronale post-ischémique (Li et al., 2010). De même, la production de VEGF par les astrocytes activés va favoriser l'angiogenèse post-AVC (Zhang et al., 2002), ce qui est requis pour une récupération fonctionnelle post-AVC (Hayakawa et al., 2010).

Tous ces travaux indiquent que les cellules immunitaires ont un rôle fondamental durant l'autoréparation du cerveau après un accident ischémique. Mais les données disponibles, à l'heure actuelle, ne fournissent qu'un aperçu de la complexité des mécanismes rétablissant l'homéostasie structurelle et fonctionnelle du cerveau après un AVC. La réparation endogène cérébrale, après un AVC, implique également la **plasticité cérébrale**. La plasticité cérébrale est définie comme l'ensemble des mécanismes qui permettent au cerveau d'adapter son fonctionnement à une situation nouvelle. Ces différents mécanismes impliquent la neurogenèse, l'oligodendrogenèse et la croissance axonale.

2. Le rôle de la plasticité cérébrale post-AVC

La **neurogenèse**, dans le cerveau des rongeurs adultes, a été mis en évidence par la découverte de cellules souches neurales produisant des neuroblastes (cellules nerveuses embryonnaires) dans la zone sous ventriculaire (SVZ, pour *SubVentricular Zone*), située au niveau du gyrus denté de l'hippocampe, près du ventricule latéral (Doetsch et al., 1997). En

conditions physiologiques et dans le cerveau des rongeurs adultes, les neuroblastes du SVZ migrent jusqu'au bulbe olfactif, où ils se différencient en neurones (Doetsch et al., 1997). Ces cellules souches neuronales sont aussi retrouvées dans la SVZ de l'Homme adulte (Curtis et al., 2007; Sanai et al., 2004). Dans des modèles expérimentaux, l'ischémie cérébrale induit une augmentation de la neurogenèse dans la SVZ ipsilatérale, et les neuroblastes migrent de la SVZ vers la zone ischémiée (Arvidsson et al., 2002; Zhang et al., 2001). Cette neurogenèse induite par un accident ischémique est aussi retrouvée chez les patients, dans la SVZ et les régions proches de l'infarctus cérébral (Jin et al., 2006; Macas et al., 2006). L'importance de la neurogenèse chez l'adulte vient de son association aux fonctions neurologiques, telles que l'apprentissage (Gould et al., 1999). L'irradiation du gyrus denté, où se trouvent des cellules souches neuronales, réduit la neurogenèse et altère la récupération fonctionnelle après une ischémie globale chez le rongeur (Raber et al., 2004). **Toute approche thérapeutique favorisant la neurogenèse, pourrait donc permettre d'améliorer la récupération fonctionnelle après une ischémie cérébrale** (Chopp et al., 2009).

Chez la souris adulte, une analyse du profil génétique des cellules pro-génitrices neuronales, provenant de la SVZ, indique que ces cellules partagent plus de 70% des gènes exprimés par les cellules embryonnaires souches neurales (Abramova et al., 2005). L'ischémie cérébrale active une multitude de gènes impliqués dans la neurogenèse durant le développement embryonnaire (Liu et al., 2007a). Après un accident ischémique, les cellules souches neuronales adultes semblent réutiliser les signaux moléculaires embryonnaires, ce qui permet probablement la migration des neuroblastes, la prolifération et la différenciation de ces cellules (Zhang et al., 2008). Des approches pharmacologiques et cellulaires permettent d'augmenter la neurogenèse dans le cerveau ischémié. Ces approches activent la voie de signalisation cellulaire de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt dans les cellules souches neurales (Chen et al., 2003b; Wang et al., 2004). Cette voie est connue pour réguler plusieurs fonctions cellulaires, telles que la survie, la prolifération, la différentiation et la migration. Akt régule la prolifération des cellules souches neuronales, et la différenciation neuronale, durant l'embryogenèse murine (Vojtek et al., 2003).

Dans un cerveau ischémié, les astrocytes forment la cicatrisation gliale le long de la lésion ischémique et produisent des protéoglycanes (composants essentiels de la MEC), ce qui inhibe la croissance axonale et agit comme une barrière physique et biochimique à la régénération axonale (Yiu and He, 2006). Les traitements supprimant l'effet des

protéoglycanes, permettent la croissance des neurites (prolongement du corps cellulaire d'un neurone) et le remodelage des axones dans les deux hémisphères, ce qui est significativement corrélé à une amélioration de la récupération fonctionnelle après un accident ischémique (Liu et al., 2007b).

La compréhension de ces différents mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'AVC ischémique a permis d'identifier des cibles thérapeutiques qui ont conduit à des essais cliniques (développés dans la partie suivante). Ces études ont révélé la complexité de cette pathologie, notamment la cinétique des différents mécanismes décrits précédemment, d'où la difficulté de la translation clinique.

II. Les approches thérapeutiques contre l'AVC

A. De la paillasse aux échecs cliniques

Les essais cliniques ont pour but l'évaluation de l'efficacité de nouveaux traitements, découverts généralement lors d'études précliniques. Les essais cliniques comprennent quatre phases. La **phase I** a pour objectif d'évaluer la tolérance et la toxicité de la molécule, en l'administrant à un petit nombre d'individus sains (10 à 40). La **phase II** évalue l'efficacité et la posologie de la molécule sur 40 à 80 patients. La **phase III** est une étude comparative entre le nouveau traitement et le traitement utilisé habituellement (lorsqu'il existe). Durant cette phase, deux groupes de patients sont constitués aléatoirement (randomisation), et comprennent généralement plusieurs milliers de malades. Si les résultats de cette phase sont en faveur du nouveau traitement, cela permet d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché (AMM), qui autorise sa commercialisation. La **phase IV** intervient après la commercialisation, et consiste en la surveillance étroite du nouveau médicament (pharmacovigilance).

Depuis une quinzaine d'années, les études précliniques et cliniques se sont focalisées sur la neuroprotection ischémique. En effet, une enquête sur PubMed révèle qu'il n'y a pratiquement pas d'études sur ce sujet avant les années 1990, mais qu'ensuite les publications sur la neuroprotection ischémique suivent une courbe exponentielle (figure 12).

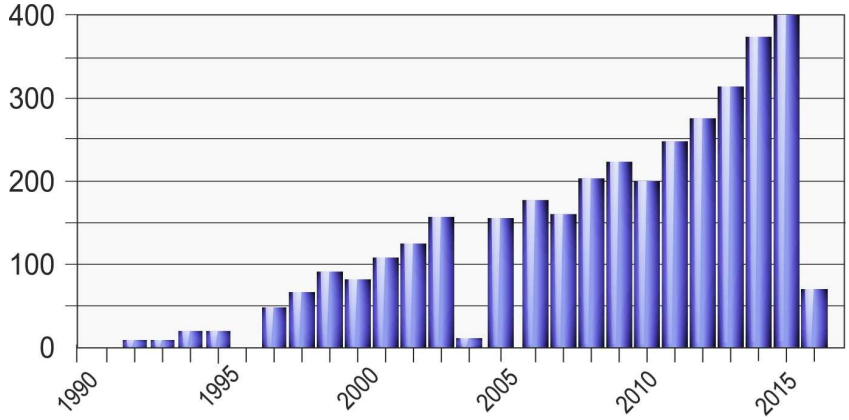


Figure 12 : Représentation graphique du nombre de publications contenant les termes « Neuroprotection » et « Stroke », d'après PubMed en Mars 2016.

Depuis le début des années 2000, plus de 3000 études expérimentales et plus de 500 études cliniques ont été publiées sur la neuroprotection ischémique. Cet élan est dû aux découvertes et aux caractérisations, faites depuis les années 1970, des différents mécanismes

impliqués dans la pathologie de l'AVC. Ainsi, la neuroprotection ischémique peut être définie comme toute stratégie, ou combinaison de stratégies permettant l'opposition, l'interruption, ou le ralentissement de la séquence des évènements biochimiques et moléculaires responsables de la lésion ischémique (Ginsberg, 2008). Cette définition exclut donc les approches thérapeutiques visant le système vasculaire cérébral, qui ont principalement pour objectif de maintenir et/ou de rétablir la circulation sanguine cérébrale, telles que les agents thrombolytiques, anti-thrombotiques ou encore antiplaquettaires.

1. Les différentes cibles identifiées comme induisant une neuroprotection

a) Les bloqueurs des canaux calciques

Du fait du rôle central qu'occupe le Ca^{2+} dans la physiopathologie de l'AVC (*cf. Chapitre I.D.1*), les bloqueurs des canaux calciques ont été les agents neuroprotecteurs les plus étudiés. En effet, l'entrée massive de Ca^{2+} dans la cellule active une multitude de voies de signalisation entraînant la lésion cérébrale. La recherche de bloqueurs de canaux calciques qui pourraient avoir un potentiel neuroprotecteur a conduit à la découverte de la Nimodipine, une dihydropyridine antagoniste des canaux calciques. C'est un composé organique dérivé de la pyridine qui exerce des effets neuronaux mais aussi sur la circulation intra-crâniale *via* son effet vasodilatateur (Kazda and Towart, 1982). Le site internet « *Stroke Center* » répertorie 26 essais cliniques concernant la Nimodipine, dont 3 sont encore en cours. Cinq grandes études randomisées en double aveugle ont étudié cette molécule, l'une d'elle a porté sur 1064 patients qui ont été traités dans les 48 heures après la survenue de l'AVC. Aucun bénéfice n'a été observé (Group, 1992). VENUS (pour *Very Early Nimodipine Use in Stroke*) fut un autre essai clinique sur 454 patients, où la molécule a été administrée dans les 6 heures après l'ischémie. L'essai a pris fin prématurément en raison de l'absence de bénéfices (Horn et al., 2001a). En prenant en compte d'autres antagonistes calciques, 47 essais cliniques, incluant 7665 patients, ont été effectués, et aucun bénéfice pour l'AVC n'a pu être associé à ces molécules (Horn and Limburg, 2000).

b) Les antagonistes des récepteurs au glutamate

Parmi les agents neuroprotecteurs les plus étudiés se trouvent aussi les antagonistes des récepteurs au glutamate. L'activation de ces récepteurs est associée avec l'entrée massive de Ca^{2+}, entraînant l'excitotoxicité et la mort des cellules par nécrose et apoptose. En clinique, ce sont principalement des antagonistes des récepteurs NMDA qui ont été testés. Par exemple,

trois molécules, ciblant ces récepteurs, ont fait l'objet d'études randomisées et se sont avérées négatives. Les trois ont été arrêtées en phase III : le Selfotel (Boast et al., 1988) et l'Aptiganel (Aronowski et al., 1994), à cause d'effets secondaires psychiatriques et cardiovasculaires, et l'Eliprodil en raison d'une absence d'efficacité. Les antagonistes des récepteurs AMPA ont aussi fait l'objet d'essais cliniques, notamment l'YM872 (Shimizu-Sasamata et al., 1998), mais qui s'est arrêtée en phase II, faute d'effet bénéfique. Aucune étude clinique n'a été menée sur des agonistes ou antagonistes des récepteurs métabotropiques.

c) Les molécules anti-inflammatoires

La neuroprotection ischémique pourrait être obtenue en ciblant les processus et les médiateurs inflammatoires qui contribuent à la lésion cérébrale (*cf. Chapitre I.D.4*). L'Enlimomab, un anticorps ciblant le récepteur de la molécule d'adhésion ICAM, a fait l'objet d'un essai clinique. Dans des modèles expérimentaux, le fait de bloquer le récepteur d'ICAM entraîne l'inhibition de l'infiltration des neutrophiles, ce qui permet la réduction des dommages ischémiques (Zhang et al., 1995). Cependant, l'essai clinique a échoué en phase III, car les patients souffraient de fièvres. Le LeukArrest (ou HU23F2G), un anticorps ciblant les neutrophiles CD11/CD18, fut aussi l'objet d'étude clinique. L'essai fut arrêté durant la phase III, car le LeukArrest n'apportait aucun bénéfice chez les patients victimes d'AVC.

d) Les chélateurs de radicaux libres

L'ischémie entraîne la production de radicaux libres et donc un stress oxydatif et nitrique. Dans des modèles d'AVC expérimentaux, neutraliser les ROS, avec le Tirilazad, permet une neuroprotection (Lapchak et al., 2001). Les essais cliniques concernant cette molécule ont été menés sur les patients victimes d'AVC ischémique et hémorragique. Les essais furent interrompus en phase III, car le Tirilazad n'apportait aucun bénéfice, voire était néfaste (Haley, 1998).

Une autre molécule anti-oxydante, le NXY-059, fut l'objet d'études cliniques. Le NXY-059 est censé avoir un mécanisme d'action de capture de radicaux libres et permet la neuroprotection ischémique dans des modèles animaux (Kuroda et al., 1999). Le NXY-059 a été étudié dans deux importantes études cliniques (randomisées et en double aveugle). Le premier essai, SAINT I, impliquait 1722 patients (Lees et al., 2006), et le second, SAINT II comprenait 3306 sujets (Shuaib et al., 2007). Dans le premier essai, leNXY-059 apportait une amélioration significative dans l'échelle de Rankin modifiée, qui permet l'évaluation clinique et fonctionnelle d'un handicap moteur (Rankin, 1957). Cependant, le NXY-059 n'améliorait

pas le score NIHSS (*National Institute of Health Stroke Score*), qui permet d'évaluer chez les patients la sévérité de l'AVC ischémique en phase aigüe (Brott et al., 1989). Par contre, les résultats du second essai, qui était plus important en terme de taille de cohorte, indiquent une absence de bénéfices du NXY-059 sur l'état de santé des patients. De plus, le traitement au NXY-059 entrainait une hypokaliémie (défaut de K^+ dans le plasma sanguin) délétère.

e) Les autres neuroprotecteurs potentiels

Le Mg^{2+} est un bloqueur des récepteurs NMDA, un inhibiteur de la libération du glutamate, un bloqueur des canaux calciques, mais aussi un vasodilatateur. Le peu d'études précliniques sur le magnésium dans l'ischémie cérébrale montre un effet neuroprotecteur. Un important essai clinique (IMAGES, *Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke Trial*) a été mené sur 2589 victimes d'AVC en phase aigüe (Muir et al., 2004). Les résultats furent négatifs, aucun bénéfice n'est apporté par le magnésium comparé au placebo.

Les inhibiteurs des canaux sodiques, tels que la fosphénytoïne (utilisée dans l'épilepsie), permettent de réduire l'amplitude des potentiels d'actions Na^+-dépendant et donc de diminuer la dépolarisation des neurones, et par conséquent de limiter l'excitotoxicité. L'essai clinique s'est interrompu en phase III, car la fosphénytoïne n'as pas d'effet neuroprotecteur dans le cadre de l'AVC.

Toujours dans l'optique de réduire l'excitotoxicité induite par l'ischémie, un activateur de canaux potassiques (hyperpolarisation), le Maxipost (BMS204352), a fait l'objet d'études cliniques. Encore une fois, la molécule n'a pas dépassé la phase III, faute d'effet bénéfique.

Plus de mille traitements contre l'ischémie cérébrale ont été étudiés expérimentalement, ce qui a conduit à évaluer plus d'une centaine de molécules en phase clinique (O'Collins et al., 2006). Malheureusement, à l'heure actuelle aucun traitement neuroprotecteur n'a dépassé la phase III des essais cliniques. **Il n'existe donc aucun médicament neuroprotecteur contre l'AVC**.

2. Les raisons du désert thérapeutique dans l'AVC

Tous les essais cliniques entrepris se sont soldés par un revers. Plusieurs facteurs ont été responsables de cette déroute.

- *L'absence de corrélation entre la fenêtre thérapeutique étudiée en préclinique et en clinique :*

Dans la majorité des essais cliniques, les traitements ont été administrés en dehors de la fenêtre thérapeutique observée en préclinique. Par exemple, l'effet neuroprotecteur de la Nimodipine (un bloqueur des canaux Ca^{2+}) est révélé uniquement lorsque l'administration est effectuée dans les 15 premières minutes suivant l'occlusion (Horn et al., 2001b). Or, en clinique le traitement à la Nimopidine a été administré entre 24 et 48 heures après l'AVC. Il en est de même pour d'autres molécules, telles que Selfotel (antagoniste des récepteurs NMDA), le LeukArrest (anticorps IgG-1 humanisé dirigé contre CD18), ou encore le Tirilazad (capteur de radicaux libres).

- *L'absence de corrélation entre l'évaluation des bénéfices chez l'Homme et l'animal* :

Les études expérimentales ont fourni la preuve qu'il était possible de réduire de manière importante (entre 70 et 80%) la lésion cérébrale ischémique, par une intervention neuroprotectrice précoce. Cependant, de nombreux agents neuroprotecteurs supposés, dont certains ont été sujets à un essai clinique, avaient montré une protection cérébrale beaucoup plus modérée voire incohérente dans les études précliniques (O'Collins et al., 2006). C'est notamment le cas de la Nimodipine. En effet, plus de 250 études expérimentales sur le rôle de la Nimodipine dans l'ischémie cérébrale ont été publiées. Cependant, une analyse minutieuse de cette littérature a permis d'identifier seulement 20 études *in vivo* d'ischémie cérébrale focale, dans lesquelles la Nimodipine a été administré en post-ischémie, et où les conséquences ont été évaluées (Horn et al., 2001b). Seulement dix d'entre elles montrent une amélioration chez les animaux ischémiés (Horn et al., 2001b). D'autre part, les différentes études précliniques varient considérablement en terme de qualité et de fiabilité. De nombreuses variables entrent en jeu dans ces études expérimentales, qui peuvent influencer la qualité et les résultats de ces études. Ces variables comprennent plusieurs facteurs, tels que le modèle animal utilisé (espèce, souche, âge, sexe), les différents anesthésiques employés, le modèle d'ischémie (globale ou focale, avec ou sans reperfusion, durée de l'ischémie...), l'analyse statistique, et bien sûr la molécule neuroprotectrice étudiée.

Dans les études expérimentales, le volume de la lésion cérébrale est mesuré quantitativement pour évaluer un traitement après l'ischémie, où il est rarement quantifié au-delà du 7ème jour après l'occlusion, alors que chez l'Homme, l'évaluation du traitement passe par des analyses de scores fonctionnels entre 3 et 6 mois après l'AVC. Ces scores sont d'une grande importance puisqu'ils reflètent l'ampleur des déficits neurologiques. Pour autant, les scores fonctionnels se prêtent moins à l'analyse statistique et pourraient être moins sensibles comparés au volume de l'infarctus ou à l'histopathologie. Dorénavant, les prochains essais

cliniques étudieront la taille de la lésion cérébrale, notamment grâce aux différentes avancées technologiques dans l'imagerie cérébrale.

- *L'absence de corrélation entre les doses étudiées en préclinique et en clinique :*

La majorité des molécules anti-excitotoxicité causent des effets indésirables au niveau neuropsychique et/ou cardiovasculaire. Ceci a, par conséquent, empêché en clinique l'utilisation des doses protectrices en préclinique. En effet, dans les études expérimentales, les doses neuroprotectrices étaient largement supérieures à celles administrées à l'Homme. C'est le cas du Selfotel (40mg/kg en préclinique et 2 mg/kg en clinique), ou encore du LeukArrest (4mg/kg en une injection 20 min après la MCAo, et la même dose répartie sur 5 jours consécutifs chez l'Homme). En moyenne la dose étudiée en clinique ne représentait qu'un cinquième de la concentration protectrice observée chez l'animal.

- *Les facteurs de comorbidité :*

La plus grande majorité des études expérimentales a été menée sur des animaux jeunes et en bonne santé, alors que le patient victime d'un AVC est typiquement âgé et présente de nombreux facteurs de risque, et potentiellement des maladies entraînant des complications lors d'un AVC (pour exemple : diabète, hypertension et maladie cardiovasculaire).

Toutes ces observations et ces données ont conduit à adopter une nouvelle politique menée par un conseil scientifique, le **STAIR** (pour « *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable* »). Il vise à améliorer la recherche et le développement de produits et de dispositifs pharmaceutiques destinés à traiter les AVC.

B. Les recommandations du STAIR

Les premières recommandations du STAIR (STAIR I), publiées en 1999, avaient pour mission d'améliorer la qualité des études précliniques des potentielles thérapies contre l'AVC ((STAIR), 1999). En effet, pour la première fois, il a été proposé à la fois un cadre expérimental pour l'évaluation des potentiels médicaments, mais aussi un point de départ pour critiquer et améliorer la façon dont est menée la recherche sur l'AVC en général. Depuis ces recommandations ont été utilisées par certains comme référence pour évaluer la qualité et l'efficacité des études expérimentales concernant une molécule, avant une évaluation dans un essai clinique. Ces recommandations ont eu un impact sur le développement de nouvelles molécules dans le cadre de l'AVC ischémique. En effet, après leur parution en 1999, les publications d'études expérimentales concernant les prétraitements contre l'ischémie ont nettement diminué. Malgré tout, la majorité des études précliniques, portant sur des agents

neuroprotecteurs ayant fait l'objet d'études cliniques, ne répondaient pas pleinement aux recommandations (Dirnagl, 2006). C'est pourquoi le conseil scientifique du STAIR a effectué quelques mises à jour, d'où ont émergé 5 points clés (Fisher et al., 2009).

1. La dose du médicament

Le premier point clé est l'établissement de la **dose-réponse**, qui a tant fait défaut dans les précédentes études expérimentales et cliniques. La dose-réponse est en fait la relation entre la quantité d'exposition à une substance (dose) et les changements consécutifs dans les fonctions physiologiques ou la santé (réponse). Une dose efficace chez le rongeur peut ne pas l'être chez d'autres animaux et/ou chez l'Homme. Comme indiqué dans le STAIR I, il est probable que l'échelle du milligramme d'un médicament par kilogramme de souris ne soit pas cohérente pour les plus gros animaux et les humains. En effet, la pharmacocinétique (étude des actions d'une substance active sur l'organisme après son administration) et la pharmacodynamique (étude de l'interaction entre la substance active et son récepteur) peuvent varier considérablement entre les espèces. Dans cette perspective, il est crucial d'étudier la courbe « dose-réponse » d'une molécule à la fois sur des petits et des grands animaux. Un autre aspect à prendre en considération : il se peut que les gammes de doses neuroprotectrices et toxiques ne se chevauchent pas avec celles tolérées par l'Homme. Malgré tout, la dose efficace minimum et la dose maximum tolérée doivent être précisément définies.

Il faudrait définir une concentration que l'on retrouverait au niveau tissulaire. Cette concentration aura été identifiée par des études histologiques et comportementales, qui pourront donner des indications, quant aux éventuels bénéfices cliniques lorsque la molécule est administrée chez l'Homme. Il faudra également s'assurer que la molécule puisse accéder à l'organe cible (pour le cas du cerveau, le passage de la BHE est un réel problème), évidemment à une concentration protectrice.

2. La fenêtre thérapeutique

Le deuxième facteur clé à considérer est la **fenêtre thérapeutique**. Cette fenêtre est la période qui débute immédiatement après un accident ischémique et durant laquelle une molécule ou un traitement est efficace (Baron et al., 1995). Actuellement, il existe un débat sur la pertinence d'une fenêtre thérapeutique chez l'animal que l'on pourrait corréler à l'humain. Pourtant, plusieurs études suggèrent que la fenêtre thérapeutique observée pour la thrombolyse, dont le but est de sauver le tissu cérébral en lysant le thrombus, est similaire chez les animaux et chez l'Homme. Par conséquent, des études sur les rongeurs semblent être

pertinents pour déterminer une fenêtre thérapeutique pour les médicaments thrombolytiques et neuroprotecteurs.

Comme le prescrit STAIR I, pour éviter les biais observés dans les études passées, notamment avec le Cerestat et le Selfotel (deux antagonistes des récepteurs NMDA), la durée optimale d'un traitement chez l'animal doit être définie précisément pour orienter au mieux le dosage en clinique. En effet, certains agents neuroprotecteurs peuvent avoir des effets paradoxaux sur la santé du patient selon le « timing » et la durée du traitement.

3. L'évaluation des séquelles

Dans tous les modèles animaux, au moins **deux séquelles** doivent être considérées : le **volume de l'infarctus cérébral** et la **récupération fonctionnelle**. La mesure des séquelles peut donc inclure la taille de la lésion cérébrale, les analyses immuno-histochimiques, la neuropathologie, l'électroencéphalographie, et l'étude neurocomportementale. Ces conséquences doivent être suivies durant la phase aiguë (1 à 3 jours post-ischémie) et à plus long terme (7 à 30 jours post-ischémie). Que ce soit dans un modèle d'occlusion permanente ou transitoire, les séquelles aiguës (typiquement la taille de la lésion cérébrale) doivent être évaluées et améliorées par le traitement. Cette évaluation précoce est nécessaire, car seules les études aiguës (jusqu'à 6 heures après l'occlusion) montrent qu'un traitement peut affecter toutes les variables physiologiques (la pression sanguine, la température, la glycémie...) et différents signes cliniques (signes d'infection ou d'inflammation vasculaire...). La plupart des études précliniques se focalisent sur les séquelles uniquement 24 heures après l'ischémie. Pourtant, il est nécessaire de suivre l'animal sur une période beaucoup plus longue, car si le traitement est montré comme étant bénéfique initialement, les effets peuvent être temporaires (Valtysson et al., 1994). En d'autres termes, il faut s'assurer que les dommages ne sont pas uniquement retardés mais bel et bien réduits. C'est pourquoi, les études à long-terme présentent un défi plus important pour la surveillance des paramètres physiologiques et l'assurance d'une conception pharmacologique adéquate.

La récupération fonctionnelle est un paramètre majeur lors des essais cliniques (Group, 1995). Chez l'Homme, la taille de la lésion n'est pas toujours corrélée avec un déficit fonctionnel, tandis que chez l'animal cette corrélation a été montrée, notamment avec des études d'IRM, comme étant beaucoup plus fiable (Tong et al., 1998). Il est donc important de démontrer un effet bénéfique d'un traitement sur la récupération fonctionnelle après une ischémie expérimentale. Si des marqueurs indirects des séquelles sont utilisés en clinique, ils doivent être examinés dans les modèles animaux.

En résumé, le conseil du STAIR recommande que des études histologiques et comportementales soient menées au moins sur 2 à 3 semaines après un AVC, afin de démontrer un avantage durable du traitement, en mettant l'accent sur les séquelles comportementales (motrices et cognitives).

4. Les modèles animaux

Il a été suggéré que l'efficacité du traitement doit être établie dans au moins 2 espèces différentes en évaluant les séquelles histologiques et comportementales. Les traitements potentiellement protecteurs doivent d'abord être testés chez les rongeurs, dans un modèle d'ischémie focale qui permet l'étude de la récupération fonctionnelle. Après l'évaluation comportementale, leurs cerveaux feront l'objet d'études histologiques permettant l'analyse du volume de l'infarctus. D'après les recommandations du STAIR il est préférable que la seconde espèce soit une espèce dite « gyrencéphalique » (dont le télencéphale présente des circonvolutions), telle que le chat ou un primate (macaques ou babouins).

5. La définition d'un cadre expérimental

Chez l'animal, le modèle d'ischémie cérébrale le plus couramment utilisé est la MCAo (box 2). Cependant, les différents modèles de MCAo peuvent être critiqués car il se peut, en particulier lors d'une occlusion permanente, qu'une reperfusion spontanée ait lieu, conduisant à une variabilité de la taille des lésions cérébrales. Le DSC doit donc être contrôlé. Le DSC est communément mesuré par un laser Doppler. Le laser Doppler mesure la perfusion sanguine microcirculatoire locale totale. La technique est basée sur l'émission d'un faisceau de lumière laser par une sonde en fibre optique. Le DSC doit être contrôlé avant, pendant et après l'ischémie, afin d'assurer une réduction adéquate du débit sanguin. Le groupe du STAIR recommande une réduction d'au moins 60% du signal du laser Doppler pour garantir une diminution du DSC appropriée. Les autres paramètres physiologiques basiques tels que la pression artérielle, la température ou encore la glycémie devraient être surveillés. La température de l'animal doit être maintenue dans une gamme physiologique, puisqu'une hyperthermie est néfaste dans le cadre de l'AVC (Ginsberg and Busto, 1998), alors qu'une hypothermie est neuroprotectrice (van der Worp et al., 2007). Le suivi de ces différents paramètres physiologiques est nécessaire dans l'optique de pouvoir reproduire les résultats obtenus. En effet, avant toute étude clinique, les résultats expérimentaux positifs obtenus dans un laboratoire doivent impérativement être répliqués dans au moins un autre laboratoire indépendant.

Bien que les recommandations initiales aient été utiles dans l'amélioration de la qualité des études précliniques, elles n'ont pas encore permis à aucun médicament d'améliorer les résultats obtenus dans la phase III des essais cliniques. Il sera impossible de valider des règles jusqu'à ce qu'il y ait une preuve définitive et reproductible d'efficacité dans les études cliniques. En attendant, les recommandations du STAIR fournissent une base de réflexion et de discussions concernant la manière d'effectuer la recherche préclinique.

Les recommandations du STAIR ont aussi contribué à porter une attention particulière à la prévention, en étant à l'origine des campagnes de prévention, qui ont permis de réduire la mortalité due à un AVC.

C. La prévention dans le cadre de l'AVC

La **prévention** comprend la prévention primaire et secondaire. La prévention primaire consiste à réduire la fréquence d'une maladie dans la population, autrement dit la diminution de l'incidence d'une maladie. Plus concrètement, cela consiste en la réduction du nombre de nouveaux cas, en réduisant les facteurs de risque au sein de la population générale. Dans le cadre de l'AVC, la prévention secondaire est mise en place lorsque l'accident a eu lieu et son but est de réduire le risque de récidive.

1. La prévention primaire et l'AVC

Selon l'OMS, la prévention primaire désigne l'ensemble des actes destinés à diminuer l'incidence d'un problème de santé, autrement dit à réduire l'apparition des nouveaux cas dans une population saine par la diminution des causes et des facteurs de risque. Ces deux dernières décennies ont permis d'identifier et de caractériser plusieurs facteurs de risque de l'AVC, qui peuvent être divisés en deux groupes : les **facteurs de risque non modifiables** et **modifiables**. Les facteurs de risque non-modifiables comprennent les facteurs liés à certains processus naturels ou encore à l'hérédité. Alors que les facteurs de risque modifiables correspondent à une certaine hygiène de vie et à l'environnement, et peuvent être modifiés avec l'aide de professionnels de santé, de traitement, ou *via* l'éducation.

a) Les facteurs de risque non-modifiables de l'AVC

L'âge est le premier facteur de risque non modifiable et l'un des plus importants, puisque 95% des AVC se produisent chez les plus de 45 ans, dont les 2 tiers des AVC chez les personnes ayant plus de 65 ans (Allen and Bayraktutan, 2008). Les effets du vieillissement

sur le système cardiovasculaire augmentent le risque d'AVC ischémique et hémorragique. Une analyse des données, provenant de 18 pays européens, montre que le risque d'avoir un AVC, fatal ou non, est augmenté de 9% par an pour les Hommes et de 10% par an pour les femmes (Asplund et al., 2009). Le risque de mortalité augmente aussi avec l'âge. Cependant, l'AVC peut se produire à n'importe quel âge, y compris les stades fœtaux. D'ailleurs des tendances inquiétantes ont été observées. En effet une étude américaine montre que la moyenne de l'âge des victimes d'AVC a diminué, passant de 71,2 ans entre 1993 à 69,2 ans en 2005, et cela est due à une augmentation de la proportion des individus âgés de 20 à 54 ans (Kissela et al., 2012). Une autre étude, effectuée entre 1998 et 2007, vient appuyer ces observations, en montrant que les personnes hospitalisées pour un AVC étaient de plus en plus jeunes (Lee et al., 2012). Un AVC, survenant chez une jeune personne, entraîne généralement des conséquences plus délétères, une plus forte réduction de l'espérance de vie et des handicaps plus importants.

Le sexe de l'individu est le 2ème facteur de risque non-modifiable. Les hommes, en comparaison aux femmes, ont un risque plus élevé, d'environ 19%, d'avoir un AVC, en particulier entre 45 et 65 ans (Holroyd-Leduc et al., 2000). Bien que le taux de mortalité par un AVC (ischémique et hémorragique) est légèrement plus élevé chez les hommes que chez les femmes, la mortalité des différents sexes, en fonction du type d'AVC, est encore peu connue. Néanmoins, une étude américaine sur plus de 600 000 victimes d'AVC, entre 1995 et 1998, a montré que le risque de mourir d'un AVC ischémique était plus élevé chez les femmes caucasiennes que chez les hommes caucasiens, mais lorsque tous les groupes ethniques sont confondus, le risque de mortalité des femmes est similaire, voire inférieur à celui des hommes. Les femmes ont un risque de mortalité plus élevé que les hommes, lorsque l'AVC ischémique survient après 65 ans (Ayala et al., 2002).

Les facteurs génétiques et les antécédents familiaux font également partie des facteurs de risque non-modifiables de l'AVC. Une méta-analyse de plusieurs études épidémiologiques a montré qu'un antécédent familial d'AVC ischémique augmente le risque de survenue d'environ 30%. D'ailleurs, des mutations intervenant sur certains gènes seraient impliquées dans l'incidence de l'AVC. L'utilisation du séquençage de l'ADN, en plus de la transcriptomique permettrait d'aider à trouver la cause de certains AVC ischémiques.

L'origine ethnique est aussi un facteur de risque d'AVC. Des études épidémiologiques démontrent que le risque d'AVC diffère en fonction de l'origine ethnique de la victime (Cruz-Flores et al., 2011). Les populations afro-américaines et hispaniques

présentent une incidence supérieure de 38% par rapport à la population caucasienne, pour tous les types d'AVC, et un taux de mortalité également plus important (Rosamond et al., 1999; Sacco et al., 1998a). Cela est particulièrement avéré pour les jeunes et les adultes afro-américains (Kleindorfer et al., 2006). Il demeure difficile de savoir si ces différences ethniques sont d'origine génétique et/ou environnementale. Les risques élevés de survenue et de mortalité d'un AVC chez les personnes d'origine africaine, pourraient être dus à une prévalence d'autres facteurs de risque tels que l'hypertension, l'obésité ou encore le diabète (ces facteurs de risque seront décrits ultérieurement) (Feinstein et al., 2012). Pour autant, une prévalence plus importante de ces facteurs de risque ne peut expliquer à elle seule cette différence entre les ethnies (Howard et al., 2011). Plusieurs études suggèrent que les différences ethniques peuvent être le résultat de déterminants sociaux, comme le lieu de résidence (Kleindorfer et al., 2012) ou de naissance (Moon et al., 2012), la langue (Howard et al., 2011), ou l'accès à la couverture médicale (Cruz-Flores et al., 2011).

La prévention du premier AVC est particulièrement importante, puisque ceux-ci représentent 75% des cas. Cette prévention repose principalement sur le dépistage et le traitement des facteurs de risque vasculaires modifiables : la pression artérielle, le diabète, l'hypercholestérolémie, l'obésité, et des comportements à risque, comme le tabagisme et la sédentarité.

b) Les facteurs de risque modifiables de l'AVC

L'hypertension artérielle (HTA), qui correspond à une hyperpression du sang sur la paroi des artères, est le facteur de risque prépondérant associé aux AVC, car près du quart de la population adulte et près de la moitié de la population âgée de 65 ans en souffrent (Trenkwalder, 2000). Une HTA est caractérisée par des chiffres de tension ≥ 140 mmHg pour la pression systolique (lorsque le cœur se contracte) ou ≤ 90 mmHg pour la pression diastolique (lorsque le cœur se dilate). L'HTA favorise l'AVC par macro- et microangiopathies, l'hémorragie intracérébrale et l'infarctus du myocarde. Parmi les victimes d'AVC, 60% d'entre eux, souffrent ou ont souffert d'HTA (Moulin et al., 1997). La relation entre la pression artérielle (PA) et le risque d'AVC est forte, graduée, et prédictive. En effet, que ce soit pour des personnes hypertendues ou non, plus la PA est importante, plus le risque d'AVC est accru (Lewington et al., 2002). Des études épidémiologiques montrent que le risque d'AVC est doublé à chaque augmentation de la pression diastolique de 7,5 mmHg chez la population occidentale (MacMahon et al., 1990). La prévalence de l'HTA a atteint un plateau au cours de la dernière décennie. Le contrôle de l'hypertension a également été

amélioré au cours des 25 dernières années, grâce aux efforts de sensibilisation et aux traitements. De nombreuses personnes ont une PA élevée, cependant leur PA est sous le seuil d'une prescription médicamenteuse (James et al., 2014). Pour réduire cette forte PA, des améliorations du mode de vie sont recommandées (Whelton et al., 2002), notamment par le « *Seventh Joint National Committee* » qui les considèrent comme une stratégie globale de lutte contre l'HTA (Chobanian et al., 2003). Néanmoins, les essais cliniques de ces 40 dernières années ont permis de démontrer qu'un traitement médicamenteux de l'HTA prévient de l'AVC (Chobanian et al., 2003). En effet, une méta-analyse de 23 essais cliniques a montré qu'un traitement par antihypertenseur permet de réduire de 32% le risque d'AVC (Psaty et al., 2003). Cette action préventive des antihypertenseurs est moins claire chez les patients souffrant de légère HTA. Malgré cela, le traitement de l'HTA est, de loin, la stratégie la plus efficace pour prévenir de l'AVC. D'après l'*American Heart Association* (AHA), l'hypertension reste sous-traitée, et des programmes supplémentaires, pour améliorer l'observance des traitements, doivent être développés.

Le diabète sucré est également un facteur de risque d'AVC, particulièrement ceux d'origine ischémique (Banerjee et al., 2012). D'après l'OMS, le diabète est une affection chronique due, soit à une insuffisance génétique ou acquise de la production d'insuline par le pancréas, soit au fait que cette insuline n'est pas assez active. Cette insuffisance provoque une augmentation de la glycémie qui conduit à son tour à des lésions affectant les vaisseaux et les nerfs. En 2013, il a été estimé qu'environ 382 millions de personnes souffrent de diabète, ce qui représente 8,3% de la population mondiale. Le risque d'AVC est augmenté plus de 2 fois lorsque le patient est diabétique, et environ 20% des patients diabétiques mourront d'un AVC (Banerjee et al., 2012). La durée du diabète augmente également le risque d'AVC (Banerjee et al., 2012). Une étude sur près de 44 000 hommes, a révélé qu'une hyperglycémie (une glycémie à jeun ≥110 mg/dL), même sans présence de diabète, est associée à un risque élevé d'AVC (Sui et al., 2011). Le risque d'AVC peut être réduit chez les patients diabétiques. En effet, dans une étude sur 160 patients atteints de diabète de type 2 (hyperglycémie chronique), un traitement médicamenteux permet de diminuer le risque de survenue de l'AVC, mais aussi de réduire le risque qu'il soit fatal (Gaede et al., 2008). Les personnes atteintes de diabète présentent une augmentation de la prévalence des facteurs de risque d'AVC, notamment l'hypertension et une dyslipidémie. C'est pourquoi un programme complet comprenant un contrôle strict de l'hypertension, avec des médicaments tels que les inhibiteurs de l'enzyme de

conversion de l'angiotensine et les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II, permet de réduire le risque d'AVC chez les personnes atteintes de diabète.

La dyslipidémie, qui est une concentration anormale de lipides dans le sang, est également liée au risque cardiovasculaire et à l'AVC. Plusieurs lipides sont retrouvés dans le plasma sanguin, le cholestérol et ses fractions, cholestérol-HDL (pour *High density lipoprotein*), cholestérol-LDL (pour *Low density lipoprotein)* et les triglycérides (TG). L'augmentation du cholestérol total et de sa fraction LDL, ainsi que la baisse de la fraction HDL, sont des facteurs de risque d'AVC. En effet, des études cliniques, montrent que le risque de mortalité d'un AVC ischémique est corrélé au niveau du cholestérol total (Iso et al., 1989). Concernant les AVC hémorragiques, l'ensemble des études épidémiologiques suggère qu'un faible niveau de cholestérol favorise leur incidence, contrairement aux AVC ischémiques qui sont favorisés par un niveau élevé de cholestérol. Le traitement de la dyslipidémie avec les statines (ou inhibiteur de la HMG-Co réductase, des molécules hypolipémiantes) réduit le risque d'AVC chez les patients atteints ou à risque d'athérosclérose (Amarenco et al., 2004). Une méta-analyse de 26 essais cliniques, qui inclut plus de 90 000 patients, révèle une réduction du risque de survenue d'AVC d'environ 20% (Amarenco et al., 2004). D'après ces études, il a été estimé qu'une réduction d'environ 15% du risque d'AVC était observée pour chaque réduction de 10% du niveau de LDL. L'effet bénéfique des statines sur l'AVC ischémique est fortement associé à leur capacité à réduire la progression de l'athérosclérose, voire à induire sa régression. Les méta-analyses des essais sur les statines montrent que le traitement par statine ralentit la progression de l'épaississement des parois des artères carotides, un effet qui serait consécutif à la réduction du LDL sanguin (Amarenco et al., 2004).

L'obésité et le surpoids sont classiquement des facteurs de risque de maladies cardiovasculaires et sont également associés à un risque élevé d'hypertension, de dyslipidémie, et d'intolérance au glucose. En 2012, une étude épidémiologique (obÉpi par Roche) a évalué la prévalence en France du surpoids et de l'obésité, 32,3% et 15%, respectivement. Toujours d'après cette étude, entre 1997 et 2012, la prévalence de l'obésité a augmenté de 76%. Aux Etats-Unis, cette prévalence a triplé pour les adolescents et doublé pour les adultes depuis les années 1980 (Ogden et al., 2012). Les catégories de corpulence sont établies selon les critères classiques à partir de l'Indice de Masse Corporelle (IMC), qui est le ratio entre le poids de l'individu (en kg) et sa taille au carré (en m^2). Lorsque cet indice est entre 18,5 et 24,9, l'individu est de corpulence dite normale, entre 25,0 et 29,9, il est en

surpoids et lorsqu'il est ≥ 30,0 le terme obésité est employé (Health, 1998). Une étude montre que l'IMC permet de prédire de façon significative la survenue d'un AVC (Wilson et al., 2008). L'obésité peut également être évaluée par la circonférence de la taille des patients, les hommes présentant un tour de taille supérieur à 102 cm et les femmes présentant un tour de taille supérieur à 88 cm, sont considérés comme ayant une obésité abdominale (Wildman et al., 2011). Cette obésité abdominale peut aussi être mesurée par le rapport taille/hanche. Pour chaque augmentation de 0,01 dans ce rapport, le risque de maladies cardiovasculaires est augmenté de 5%. L'obésité abdominale serait un meilleur prédicateur de risque d'AVC que l'IMC (Suk et al., 2003). Des études prospectives, sur la relation entre le poids (ou la mesure du tour de taille) et l'incidence de l'AVC, indiquent que lorsque l'IMC est entre 25 et 50 kg/m^2, chaque augmentation de 5 kg/m^2 est associée à une élévation de 40% de la mortalité par un AVC. En revanche, lorsque l'IMC est < 25, il n'existe aucune relation entre l'IMC et la mortalité (Prospective Studies et al., 2009). Que ce soit la mesure de la distribution de la masse grasse ou l'IMC, leur association avec l'incidence de l'AVC est également associée au diabète, à l'hypertension ou encore le tabagisme (Toss et al., 2011).

Le tabagisme représente également un facteur de risque d'AVC ischémique. La relation entre le tabagisme et l'athérosclérose a été mise en évidence pour la première fois au début du 20ème siècle, par l'observation d'une fréquence élevée d'AVC ischémique chez les fumeurs de sexe masculin (Hankey, 1999). L'étude du « *Framingham Heart* » fut la première à évaluer la relation entre le tabagisme et le type d'AVC, en prenant en compte le nombre de cigarettes fumées et l'effet de l'arrêt du tabac. Les résultats de cette étude montrent que le risque d'AVC chez les « gros fumeurs » (>40/jour) était deux fois plus élevé que celui des « petits fumeurs » (<10/jour), et ce risque augmentait avec le nombre de cigarettes fumées. Une étude épidémiologique suggère qu'entre 12 et 14% des AVC mortels seraient attribuables au tabagisme (Thun et al., 2000). Le tabagisme passif est un facteur de risque pour les maladies cardiovasculaires, et le serait également pour l'AVC, avec un impact aussi important que le tabagisme actif (Bonita et al., 1999). Le tabagisme favoriserait l'incidence de l'AVC par des effets à court-terme, avec une augmentation du risque de générer un thrombus, et à plus long-terme avec une accentuation de l'athérosclérose (Burns, 2003). Néanmoins, l'arrêt du tabac permet de diminuer le risque d'AVC : en effet après 2 ans d'arrêt, la diminution du risque devient significative et atteint le niveau de risque d'un non-fumeur après 5 ans d'arrêt (Wolf et al., 1988).

L'inactivité physique est associée à de nombreux effets néfastes sur la santé, notamment au risque accru de mortalité en général, mais aussi de morbidité et de mortalité liées aux maladies cardiovasculaires, dont l'AVC (Fletcher, 1994). A l'inverse, une activité physique permet de réduire entre 25 et 30% le risque de survenue et de mortalité par l'AVC (Sacco et al., 1998b). Cet effet bénéfique pourrait être dû en partie à la réduction de certains des facteurs de risque. En effet, l'activité physique réduit la pression artérielle (Fagard, 2006), augmente la sensibilité à l'insuline, régule les lipides plasmatiques (Butcher et al., 2008), et favorise les effets anti-inflammatoires (Kasapis and Thompson, 2005). D'ailleurs, une étude prospective sur 27 055 femmes, montre que l'activité physique réduit les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, dont l'AVC, ce qui a pour finalité de réduire l'incidence de ces pathologies (Mora et al., 2007). Pour réduire l'incidence de l'AVC, et plus généralement pour une bonne santé, l'AHA recommande 30 minutes d'activité physique d'intensité modérée (marche rapide) au moins 5 fois par semaine, ou 20 minutes d'intensité élevée (course à pied) au moins 2 fois par semaine, ou encore une combinaison des deux intensités (Services, 2008).

2. La prévention secondaire et l'AVC

D'après l'OMS, la prévention secondaire comprend «tous les actes destinés à réduire la durée d'évolution de la maladie». Elle prend en compte le traitement des premières atteintes mais aussi la récidive. La prévention des récidives d'AVC a été l'une des principales avancées thérapeutiques dans la gestion de l'AVC dans les 30 dernières années. En 1977, il n'existait aucune stratégie de prévention secondaire dans le cadre de l'AVC. Depuis 1978, avec l'introduction de l'aspirine, jusqu'à récemment en 2006 et l'introduction de l'atorvastatine (un hypolémiant), il existe aujourd'hui un large éventail de stratégies de prévention secondaire disponible pour les patients. Nous allons discuter de certaines de ces stratégies.

a) Les agents anticoagulants

Un **anticoagulant**, tel que l'aspirine, est une substance chimique ayant la propriété d'inhiber la coagulabilité naturelle du sang. La coagulabilité est un processus complexe aboutissant à la formation de caillots sanguins. Le sang traité ne coagulera pas ou alors moins vite, et gardera la même viscosité.

L'anticoagulant **Warfarin** est l'une des stratégies de prévention secondaire les plus efficaces biologiquement, puisqu'il réduit d'environ 70% le risque relatif de récidive d'AVC chez les patients ayant eu un accident ischémique transitoire (AIT) (EAFT, 1993). Néanmoins, la Warfarin est associée à un faible risque d'hémorragie, qui augmente avec l'âge, l'HTA, et l'utilisation d'autres agents antiplaquettaires (Hart et al., 2005). La combinaison de la Warfarin et de l'aspirine serait aussi associée à un risque accru d'hémorragie, sans apporter plus de bénéfices (Akins et al., 2007). Chez les patients qui ne souffrent pas de fibrillation auriculaire, mais ayant eu un AIT ou un AVC mineur, la Warfarin n'est pas meilleure que l'aspirine en tant que stratégie de prévention secondaire (Mohr et al., 2001).

b) Les agents antiplaquettaires

L'athérosclérose se complique fréquemment en AVC. Le point de départ est la mise à nu de l'endothélium et le contact entre le sous-endothélium et la circulation sanguine. Ceci concourt à l'adhésion plaquettaire (éléments du sang fabriqués par la moelle osseuse) par la fixation des récepteurs spécifiques (GPIIbIIIa) sur les structures d'adhésion par l'intermédiaire du facteur de Willebrand (thrombus blanc), suivie d'une activation et d'une agrégation de ces cellules (thrombus rouge). La thrombose peut évoluer de différentes manières : soit se désagréger spontanément, soit adhérer à la paroi, s'endothélialiser et constituer une chape fibreuse (sténose), soit emboliser.

Les différents agents antiplaquettaires évalués dans les essais cliniques pour la prévention secondaire de l'AVC permettent une réduction d'environ 22% du risque relatif d'une récidive (Antithrombotic Trialists, 2002). Pour les patients victimes d'AIT ou d'AVC mineur, la réduction du risque relative avec seulement l'aspirine (à n'importe quelle dose) est d'au moins de 13%, mais cette protection pourrait être doublée par l'addition du dipyridamole à libération prolongée (un autre agent antiplaquettaire) (Group et al., 2006).

Le traitement préventif traditionnel est l'association de l'aspirine et du dipyridamole à libération prolongée. Le clopidogrel est utilisé en cas d'allergie à l'aspirine ou d'insuffisance coronarienne (rétrécissement des artères cardiaques entraînant une ischémie du myocarde). Chez les patients à risque de récidive, un traitement combinant l'aspirine et le clopidogrel est associé à une réduction non significative de survenue d'un accident ischémique, et le risque d'hémorragie est quant à lui significativement augmenté (Diener et al., 2004). Un traitement avec les antagonistes des récepteurs GPIIbIIIa est associé à une mortalité plus élevée (Topol et al., 2003). D'après toutes ces études, il existerait un effet de plafond pour les effets

bénéfiques des antiplaquettaires, au-delà duquel des effets indésirables, principalement des hémorragies, surpassent toute efficacité supplémentaire.

La prévention n'a pas permis de réduire totalement la survenue des AVC et l'une des plus grandes avancées dans le cadre de l'AVC concerne tout le processus de prise en charge et de soins des patients victimes d'AVC. En effet, la prise en charge précoce des patients victimes d'un AVC a profondément évolué depuis la mise en place des **unités neuro-vasculaires** (UNV) puis, en 2002, avec l'AMM de **l'activateur recombinant du plasminogène** (rt-PA), le traitement de référence dans l'AVC.

D. La prise en charge et les soins des patients victimes d'AVC

L'AVC est une urgence absolue : à chaque minute qui passe, près de 2 millions de neurones sont détruits, comparé à une perte neuronale due au vieillissement, le cerveau ischémié vieillit de 3,6 ans chaque heure passée sans traitement (Saver, 2006). Ceci est parfaitement résumé par la célèbre phrase américaine « *Time is Brain* » (Gomez, 1993). Ce constat souligne l'importance d'une prise en charge rapide des patients ayant des signes évocateurs d'un AVC. Lorsqu'un patient est admis dans une UNV, une imagerie cérébrale (IRM ou scanner) est rapidement réalisée pour déterminer l'éligibilité du patient au seul traitement disponible contre les AVC ischémiques, la **thrombolyse**.

1. La thrombolyse par voie intraveineuse

La restauration précoce du flux sanguin cérébral, par la lyse du caillot sanguin et la reperfusion, est la seule stratégie pharmaceutique qui améliore le pronostic des patients atteints d'un AVC ischémique. La thrombolyse consiste à lyser le thrombus (ou caillot sanguin) à l'aide d'un médicament, ***l'activateur tissulaire du plasminogène*** *(t-PA, pour « tissue plasminogen activator »).* Le t-PA est une enzyme protéolytique initiant la fibrinolyse, qui est un processus physiologique complexe de dissolution des caillots sanguins constitués de fibrine. Concrètement, le t-PA active le plasminogène qui entraîne la libération de la plasmine dans le sang. La plasmine est une enzyme, plus précisément une peptidase qui catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques, ce qui permet ainsi la dégradation de la fibrine, le principal constituant des caillots sanguins, entraînant leur dissolution (figure 13).

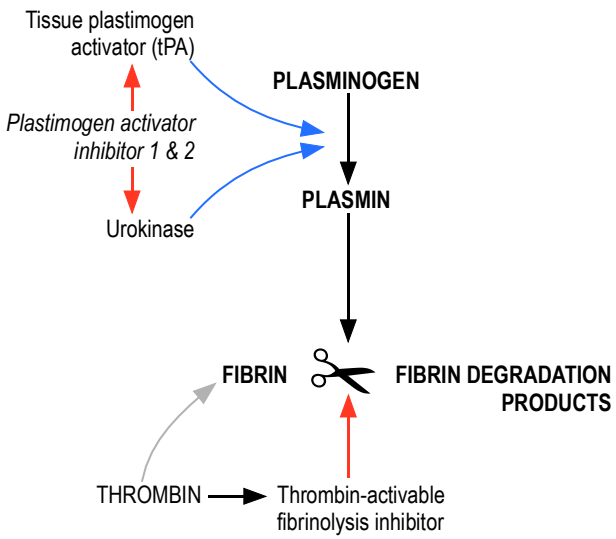


Figure 13 : Schéma illustrant la fibrinolyse, les flèches bleues étant une stimulation et les flèches rouges une inhibition (d'après Wikipédia)

La particularité de ce traitement est de ne pas avoir été étudié en préclinique avant d'avoir obtenu l'AMM. Les premières études cliniques de la thrombolyse au cours d'un AVC remontent à 1958. Ces essais ont été rapidement abandonnés en raison d'une surmortalité due à des hémorragies cérébrales. Une sélection inappropriée des patients, des délais trop longs entre l'apparition des signes cliniques et l'administration des médicaments étaient à la base de cet échec thérapeutique. Le développement des techniques d'imagerie cérébrale a permis une meilleure sélection des candidats à la thrombolyse. Ainsi de nouvelles études ont été reconduites, testant des agents thrombolytiques durant la phase aiguë de l'AVC ischémique. L'étude du NINDS (« *Natitonal institute of neurological disorders and stroke* ») a révolutionné le traitement de l'AVC ischémique aigu (Group, 1995). En effet, cette étude évaluait l'efficacité clinique d'un activateur recombinant du plasminogène (rt-PA IV ; Actilyse®), administré par voie intraveineuse (i.v) dans les 24 premières heures, sur la récupération neurologique et le handicap fonctionnel (avec l'échelle modifiée de Rankin) à 3 mois. Le taux de mortalité à 3 mois a été diminué par l'administration du rt-PA (17% contre 21% dans le groupe placebo). Les bénéfices thérapeutiques étaient supérieurs lorsque le traitement était administré dans les 90 premières minutes suivant l'apparition des signes cliniques (Marler et al., 2000). Ainsi, grâce au traitement rt-PA par voie *i.v*, épargner un handicap important à un patient sur sept devenait possible. Par contre, les études incluant des patients avec un délai supérieur à 3 heures se sont révélées négatives.

Les résultats de l'étude NINDS ont permis, en 1996, l'approbation du rt-PA par la FDA (« *Food and Drug Administration* ») et donc la diffusion de la thrombolyse intraveineuse aux

Etats-Unis, dans une fenêtre thérapeutique de 3 heures après l'apparition des symptômes cliniques. La thrombolyse est le premier médicament, et d'ailleurs le seul à ce jour, approuvé dans le traitement de l'AVC ischémique. En 2002, le rt-PA a obtenu l'AMM en Europe. En 2008, les résultats de l'étude ECAS III (« *European Cooperative Acute Stroke Study* ») permettent d'élargir la fenêtre thérapeutique jusqu'à 4,5 heures (Hacke et al., 2008).

Administrer le t-PA, au-delà des 4,5 heures, est trop dangereux pour le patient dû au risque accru d'hémorragie. Ce risque hémorragique est la conséquence d'une altération de la BHE (Yepes et al., 2003). Le t-PA permet l'activation du facteur de transcription NFKB, entraînant la synthèse de MMP-3 et MMP-9, et donc la dégradation des protéines matricielles de la BHE (Wang et al., 2003). D'ailleurs, la plasmine, libérée par l'action du t-PA, clive CCL2, entraînant une augmentation de son pouvoir chimiotactique, et de ce fait une augmentation de la perméabilité de la BHE (Yao and Tsirka, 2011). Ainsi, le t-PA joue un rôle dans la neuroinflammation : au-delà de l'altération de la BHE, le t-PA induit aussi l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1) sur les cellules endothéliales cérébrales (Wang et al., 2014), nécessaire à l'infiltration leucocytaire. De plus, le t-PA favorise l'activation microgliale par un effet « cytokine », en se fixant sur une protéine membranaire, l'annexine II (Siao and Tsirka, 2002). Cette activation est associée à un phénotype pro-inflammatoire M1 (Won et al., 2015). En résumé, le complexe d'activation du plasminogène, originellement décrit pour son rôle dans la régulation de la fibrinolyse dans la circulation sanguine, pourrait être un acteur majeur dans la neuroinflammation (Mehra et al., 2015), et ainsi participer aux dommages ischémiques une fois administré en dehors de sa fenêtre thérapeutique.

Malheureusement, le nombre de patients pouvant recevoir ce traitement, dans ce délai, est faible. En effet, cela représente moins de 10% des patients admis dans les structures spécialisé dans la prise en charge de l'AVC, les **UNV** (Moskowitz et al., 2010).

2. Les Unités Neuro-Vasculaires

Une **unité neuro-vasculaire** est une structure dédiée à la prise en charge des pathologies neuro-vasculaires aiguës, telles que les AVC et les AIT. L'UNV accueille et prend en charge 24h/24 et 7j/7 des patients présentant ces pathologies. Ce concept de soins, organisés au sein d'une seule et même structure, a vu le jour dans les années 1950. Les premières unités spécialisées ont été créées au début des années 1970 (Kennedy et al., 1970). Les UNV sont constituées d'un personnel médical et non médical. La prise en charge en urgence des AVC par l'UNV a plusieurs objectifs. Le premier est d'établir le diagnostic, par

examen clinique et par imagerie cérébrale (IRM préférentiellement), avant d'instaurer un traitement anti-thrombotique ou thrombolytique. Enfin, l'autre objectif de ces structures est de débuter, au plus tôt, le traitement approprié afin d'éviter les complications immédiates (générales et neurologiques), qui peuvent aggraver le pronostic vital et les lésion ischémiques. Les mesures de prévention secondaire sont mises en place afin de prévenir les récidives. Tout ceci a pour but de placer le patient dans les meilleures conditions pour récupérer grâce à des soins de réadaptation spécifiques débutés précocement.

L'hypothèse qu'une prise en charge spécifique pourrait améliorer le pronostic des patients victimes d'AVC a donné lieu à des études cliniques randomisées pour démontrer l'avantage de ces structures. À noter, la particularité de cette méthode qui consiste à révéler le bénéfice d'une organisation de soins selon le modèle de l'essai thérapeutique randomisé utilisé pour les médicaments. Ces essais cliniques ont fait l'objet de plusieurs méta-analyses (Hommel et al., 1999; Langhorne et al., 1993). La « collaboration Cochrane » (Stroke Unit Trialists, 2013) a évalué 28 essais cliniques sur le devenir de 5855 patients pris en charge, soit par une UNV, soit par un service médical conventionnel. Le devenir de ces patients a été évaluée sur trois critères : 1) le décès à la fin de l'étude (sur un an) ; 2) le décès ou l'institutionnalisation à la fin de la période de rééducation (dans une résidence d'accueil, un service de long séjour, ou à l'hôpital) ; 3) le décès ou la dépendance (score de Rankin > 2). Quelque soit le critère choisi, les résultats sont en faveur des UNV. La diminution de la mortalité, observée quelque soit la cause de décès, serait essentiellement liée à la réduction des complications intercurrentes, à l'augmentation du nombre de retours au domicile, et à la réduction de la dépendance. La qualité de vie après un AVC est améliorée chez les patients traités dans une UNV. Ce bénéfice vital et fonctionnel se maintient 10 ans après l'AVC, les patients qui survivent n'ont pas de risque accru de récidive ou d'handicap à long terme. Ces bénéfices sont observés indépendamment de l'âge, du sexe et de la gravité de l'AVC. Ces UNV permettraient de réduire le coût direct de la prise en charge des AVC et n'augmenteraient pas le temps de séjour à l'hôpital.

Ces données sont en accord avec celles obtenus, avant même que le traitement thrombolytique ne soit encore totalement développé, prouvant ainsi un bénéfice de la qualité de la prise en charge, indépendamment du traitement (Hommel et al., 1999; Langhorne et al., 1993; Ronning and Guldvog, 1998). Plus marquant encore, comparé aux autres approches médicamenteuses (aspirine ou agents thrombolytiques), les UNV permettent d'agir sur une

population plus large et d'avoir un meilleur impact en termes de réduction du nombre de décès et/ou de dépendance.

D'après l'OMS, la prévalence mondiale de l'AVC risque encore d'augmenter jusqu'en 2030 (23 millions contre 16 millions en 2005). Dans les pays développés, la prévention et l'évolution de la prise en charge de l'AVC ont permis de réduire significativement le nombre de décès dus aux AVC ischémiques, notamment depuis les années 2000 (Feigin et al., 2009) (Bejot et al., 2007b). Les survivants présentent souvent des séquelles affectant leur qualité de vie. C'est pourquoi, l'AVC reste la cause majeure de handicap acquis dans le monde. À l'heure actuelle, le nouveau défi est de réduire ces séquelles, afin d'améliorer la récupération fonctionnelle post-AVC.

3. Les stratégies de récupération fonctionnelle post-AVC

La **récupération** est un phénomène spontané, rarement total dans le cadre de l'AVC, et observé même en l'absence de **réadaptation**. La réadaptation est une partie importante du processus de rétablissement. L'objectif de la réadaptation est d'améliorer l'autonomie des patients. Dans les années 1990, une étude de cohorte a confirmé l'existence d'une récupération motrice touchant toutes les catégories de patients hémiplégiques, y compris les plus sévèrement atteints initialement (Jorgensen et al., 1995b, c). Autre résultat marquant, l'essentiel des progrès est effectué au cours des 15 premières semaines. Plusieurs autres études ont confirmé cette cinétique de la récupération motrice, et il est classique maintenant de définir les séquelles motrices comme définitives à partir du 6ème mois. Parallèlement, le nombre d'études concernant l'effet de la réadaptation sur la récupération n'a cessé d'augmenter depuis les années 1980. **Toutes s'accordent à dire que la réadaptation améliore la récupération post-AVC**.

a) La stratégie actuelle : la réadaptation

La réadaptation aide les survivants d'un AVC à récupérer leurs facultés intellectuelles et leurs fonctionnalités physiques dégradées. La réadaptation permet également d'apprendre, aux patients, de nouvelles façons d'exécuter des tâches journalières (se laver, s'habiller ou encore s'exprimer efficacement), en contournant ou en compensant leurs troubles résiduels. La réadaptation est principalement basée sur la répétition, et donc la « mémoire du corps », tout comme lorsque nous apprenons une nouvelle compétence, telle que faire du vélo ou un

service au tennis. Depuis maintenant 30 ans, différentes méta-analyses n'ont cessé de renforcer la preuve de l'efficacité de la réadaptation sur la récupération motrice après un AVC (Kwakkel et al., 2004b; Langhorne et al., 2011; Pollock et al., 2014a; Pollock et al., 2014b; Veerbeek et al., 2014). Actuellement 467 essais cliniques peuvent être identifiés sur cette question représentant 25 373 patients (Veerbeek et al., 2014). La prise en charge de la réadaptation permet d'améliorer la récupération du déficit moteur des membres inférieurs et supérieurs (Kwakkel et al., 1999), de la marche (van de Port et al., 2007) et de l'équilibre (Pollock et al., 2007) et de l'autonomie dans les activités de la vie quotidienne (Langhorne et al., 2011). La précocité de la prise en charge est un facteur clé de l'efficacité de la réadaptation (Langhorne et al., 2011). En effet, la réadaptation doit commencer dans la phase aiguë de l'AVC (avant le 14ème jour), et plus précisément dans les 48 heures après l'AVC. L'intensité de la prise en charge est aussi un facteur essentiel de l'efficacité de la réadaptation (Kwakkel et al., 2004b).

b) Les nouvelles stratégies de récupération post-AVC

A l'instar du développement des médicaments pharmaceutiques, le processus de translation clinique exige que les stratégies de réadaptation post-AVC soient fonctionnelles (Kwakkel et al., 2004a). Ici, nous discuterons de certaines de ces nouvelles stratégies de réadaptation post-AVC. Ces stratégies se sont focalisées sur la récupération de la fonction motrice des patients ayant subi un AVC et la majorité de ces stratégies sont basées sur une approche mécanique, puisqu'une activité physique permet de réduire les séquelles. Néanmoins, l'activité physique est limitée chez ces patients. Voici quelques approches qui ont été évaluées afin d'y remédier (certaines sont encore en cours de développement).

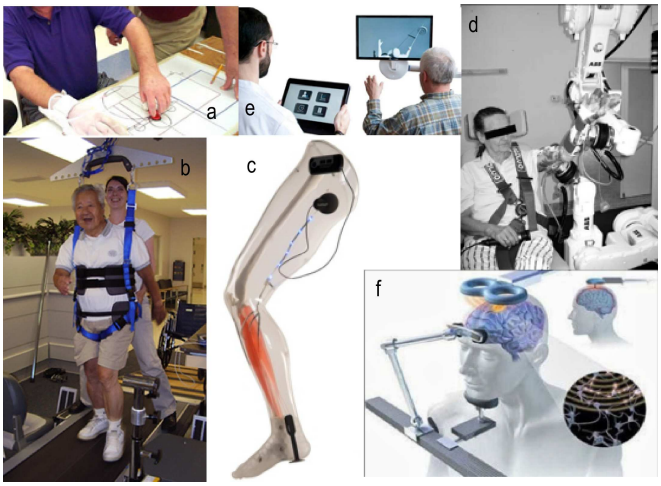


Figure 14 : Les différentes techniques de réadaptation : la thérapie induite par contrainte (a), la marche avec support de poids corporel (b), la stimulation électrique fonctionnelle (c), l'assistance robotique (d), la réalité virtuelle (e), la stimulation cérébrale non invasive (f).

La thérapie induite par contrainte est basée sur les observations en laboratoire de la « non-utilisation apprise » chez les primates (Knapp et al., 1958). Cette thérapie consiste à forcer l'utilisation de la partie du corps hémiparétique, en limitant l'utilisation de la partie saine (Ostendorf and Wolf, 1981) (figure 14a). Concrètement, le patient utilise son membre déficient de manière répétée et intensive durant une certaine période. Cette méthode permet d'améliorer la récupération des membres supérieurs chez les patients hémiplégiques après un AVC (Taub et al., 2006). Cependant, la thérapie contrainte est une technique qui s'adresse à une petite fraction des malades parétiques. Elle reste inapplicable chez les patients trop déficitaires ou pendant les premières étapes de la réadaptation.

Le réentraînement de la marche avec support de poids corporel est basée sur les bénéfices de la marche, puisqu'elle permet d'améliorer la réadaptation et l'aptitude à se déplacer après un AVC (Eng and Tang, 2007). Cette technique est une sorte de thérapie induite par la contrainte, car il s'agit de supporter le poids corporel par un harnais suspendu au plafond (figure 14b). Le harnais permet, tout en marchant sur le tapis roulant, de garder le contrôle de la posture et de réduire le poids du patient sur ses pieds, et donc de pratiquer une marche proche de la normale évitant de développer une marche compensatoire. Le mécanisme biologique sous-jacent à cette approche pourrait être la plasticité cérébrale, et plus particulièrement des changements dans l'activation corticale (Enzinger et al., 2009).

Des études récentes, montrent que cette méthode permet **une récupération plus rapide** (Ada et al., 2010). Les patients traités remarchent 2 semaines avant les patients ayant reçu les soins habituels. En outre, 14% de plus des patients du groupe traité ont regagné leur domicile avec une récupération quasi complète ainsi qu'une réduction de l'état dépressif.

La stimulation électrique fonctionnelle (SEF), chez les patients victimes d'AVC hémiparétiques, fournit de manière contournée une voie d'entrée du SNC vers les muscles du membre déficient. L'utilisation d'une stimulation électrique d'un nerf périphérique, la SEF génère des potentiels d'action dans les motoneurones (cellules nerveuses connectées directement à un muscle), qui se propagent vers le muscle causant sa contraction (figure 14c). Le steppage (dit aussi « pied tombant ») est une paralysie d'origine nerveuse des muscles releveurs du pied et des orteils qui engendre une anomalie de la marche chez les victimes

d'AVC (Richards et al., 1999). En 2006, une étude de Cochrane a mis en évidence un effet bénéfique de la SEF sur les membres inférieurs, comparé au groupe contrôle n'ayant pas reçu de traitement (Pomeroy et al., 2006). La SEF des membres supérieurs semble avoir également un impact positif sur la récupération motrice au niveau du poignet (Powell et al., 1999). A l'heure actuelle, pour la Haute Autorité de Santé (HAS), l'intérêt de la SEF pour la récupération du membre supérieur n'est pas démontré, mais elle est tout de même recommandée pour améliorer la marche.

La thérapie assistée par robotique est utile dans le traitement de l'hémiparésie après un AVC (Kwakkel et al., 2008). La robotique permet aux patients de produire, de manière indépendante, un effort améliorant leur niveau fonctionnel, en employant une forte intensité d'entraînement, ce qui ne peut être effectué avec la marche avec support de poids corporel par exemple (figure 14d). La robotique a d'autres avantages comme l'intégration des stimuli visuels et tactiles. Elle favorise la participation du patient, et permet la répétition de mouvements spécifiques (Hidler et al., 2005). Des essais cliniques ont évalué cette thérapie sur la réadaptation des membres inférieurs et supérieurs (Chang and Kim, 2013). D'après l'analyse de 7 essais randomisés et contrôlés, la thérapie robotique n'est pas en mesure de remplacer les soins conventionnels pour améliorer la marche chez les patients victimes d'un AVC. Une méta-analyse de 2012 a permis de mettre en évidence que la thérapie robotique améliore la fonction motrice des membres supérieurs et les activités de la vie quotidienne, uniquement dans la phase subaiguë de l'AVC (Mehrholz et al., 2012).

Actuellement, la robotique dans la réadaptation post-AVC est à considérer comme un complément de l'approche conventionnelle.

La réalité virtuelle (RV) a fait l'objet d'études dans la récupération fonctionnelle post-AVC. En effet, l'intégration de la RV permet une immersion du patient dans un environnement riche en stimulations cognitives et sensorielles, ce qui favoriserait la plasticité cérébrale, et donc la récupération motrice. La RV consiste en une interface utilisateur-ordinateur, impliquant la stimulation en temps réel et les interactions d'un utilisateur immergé grâce aux multiples voies sensorielles dans un milieu virtuel (figure 14e). Une revue de Cochrane, reprenant 37 études cliniques, a comparé les effets de la RV sur la fonction motrice du membre supérieur après un AVC par rapport à une autre, ou à l'absence d'une intervention traditionnelle (Laver et al., 2015). Cette revue suggère de légers effets bénéfiques sur la récupération motrice. A l'avenir, ces technologies pourraient apporter aux patients une amélioration de la réadaptation à leur domicile (Iosa et al., 2012).

La stimulation cérébrale non-invasive pourrait être un support pour la réadaptation fonctionnelle post-AVC (Webster et al., 2006). Les deux techniques de stimulation cérébrale les plus courantes sont la stimulation magnétique transcrânienne (TMS) et la stimulation transcrânienne à courant direct (tDCS). La TMS utilise un champ magnétique changeant rapidement pour induire des courants électriques dans le cerveau, provoquant la dépolarisation des potentiels d'action neuronaux. La tDCS utilise, quant à elle, de faibles courants électriques transmis au cerveau par l'intermédiaire d'éponges imbibées placées sur le site de stimulation. Le principal objectif de la stimulation cérébrale dans la réadaptation d'AVC est de modifier l'activité corticale et la neuroplasticité par une augmentation de l'excitabilité corticale ipsilatérale et/ou une diminution de l'excitabilité corticale contralatérale (Webster et al., 2006) (figure 14f). La TMS et la tDCS sont sûres et efficaces dans la modulation de l'excitabilité corticale et améliorent l'adaptation motrice, l'apprentissage et la consolidation de la mémoire motrice chez les sujets sains mais aussi chez les survivants d'un AVC (Reis et al., 2008). D'autres part, la modulation de l'excitabilité corticale est associée à une amélioration des performances motrices et du pronostic des patients victimes d'AVC (Adeyemo et al., 2012; Kim et al., 2006; Takeuchi et al., 2008). Bien que ces résultats semblent prometteurs et encourageants, le rôle des stimulations cérébrales dans la réadaptation de l'AVC reste incertain (Hao et al., 2013).

Si de grandes avancées ont été effectuées dans le cadre de la réadaptation motrice post-AVC, très peu d'études interventionnelles ont été menées pour améliorer la récupération cognitive post-AVC. Certaines études ont montré que des stratégies de compensation permettaient d'atténuer les troubles de l'attention chez les victimes d'un AVC (Langhorne et al., 2011). Quant aux déficits mnésiques, peu d'études ont été menées à ce sujet.

Les stratégies visant à améliorer la récupération fonctionnelle, et plus généralement la santé des victimes d'AVC, qui sont développées et mises en place à ce jour, intègrent plusieurs paramètres, et tentent d'être les plus globales possible. Dans ce contexte, la nutrition pourrait être intégrée dans une approche thérapeutique contre l'AVC.

III. La nutrition, une approche thérapeutique contre l'AVC

En terme de prévention, la nutrition s'inscrit totalement dans une approche thérapeutique. En effet, la nutrition est liée à plusieurs facteurs de risque d'AVC, et peut constituer, en elle-même, un facteur de risque.

A. Nutrition et AVC : entre risque et bénéfice

Quelque soit son niveau, la **nutrition** est associée au risque de survenue d'AVC. En effet, certains nutriments, aliments ou encore régimes alimentaires peuvent affecter le risque d'AVC.

Un des nutriments les plus néfastes dans le cadre de l'AVC est le **sodium**. En effet, une augmentation de l'apport en Na^+ dans l'alimentation augmente la pression artérielle, le principal facteur de risque d'AVC (Sacks et al., 2001). Que ce soit les études prospectives (He et al., 1999) ou les méta-analyses (Li et al., 2012), toutes s'accordent à dire qu'un apport élevé en Na^+ est associé à un risque accru d'AVC. Au niveau des aliments, la consommation de viandes rouges transformées (charcuterie, viande salée, fumée...) augmenterait le risque de survenue de l'AVC (Larsson et al., 2011b; Micha et al., 2010). Certains régimes alimentaires ont été identifiés comme étant d'importants facteurs de risque d'AVC (Fung et al., 2004; O'Donnell et al., 2010). L'étude « INTERSTROKE » a évalué l'effet du régime alimentaire, déterminé à partir d'un questionnaire, sur le risque de survenue d'AVC. Cette étude montre que les régimes dits « malsains », associés à une consommation plus fréquente de viandes, de collations salées, de sucreries ou encore d'aliments frits, sont des facteurs de risque d'AVC (O'Donnell et al., 2010). Une étude prospective a montré qu'un régime de type occidental, caractérisé par une forte consommation de viandes rouges transformées, de céréales raffinées, de sucreries et de desserts, est associé à une augmentation du risque d'AVC (Fung et al., 2004).

Si la nutrition est associée à plusieurs facteurs de risque, elle peut également jouer un rôle protecteur dans l'AVC.

Certains nutriments sont capables de prévenir la survenue de l'AVC. C'est le cas du **potassium** (Ascherio et al., 1998; Larsson et al., 2011a). Des études cliniques ont révélé qu'une augmentation de l'apport en K^+ diminue la pression artérielle (Whelton et al., 1997), atténuant même les effets du Na^+ (Morris et al., 1999). D'autres études épidémiologiques ont trouvé qu'une augmentation de la consommation d'**acides gras polyinsaturés oméga-3**

(AGPIs ω-3) est associée à une réduction du risque d'AVC (Galimanis et al., 2009). D'ailleurs certaines études épidémiologiques révèlent plusieurs bénéfices de ces AGPIs ω-3 sur les maladies cardiovasculaires (Hooper et al., 2006). Néanmoins, ces bénéfices restent controversés, car d'autres études ne révèlent aucun effet de ces AGPIs ω-3 (Kakar et al., 2008). Les données sur l'AVC restent limitées et inconsistantes (Kakar et al., 2008).

Au niveau des aliments, la consommation accrue **de fruits et de légumes** permet de réduire la survenue d'AVC, sa conclusion étant un soutien pour les recommandations actuelles (5 fruits et légumes par jour) (He et al., 2006). Comparés aux individus consommant moins de 3 portions de fruits et légumes par jour, le risque relatif d'AVC est plus faible chez ceux en consommant entre 3 et 5 portions par jour, et encore plus faible chez ceux qui en consomment plus de 5 portions par jour. Cette relation « dose-réponse » se prolonge pour les apports supérieurs. La consommation de **poisson** (source de protéines et d'AGPI ω-3) trois fois par semaine est associée à une réduction significative du risque d'AVC (Larsson and Orsini, 2011).

Un essai randomisé, sur plus de 7000 individus, a montré qu'un régime méditerranéen associé à une supplémentation en noix et/ou en huile d'olive, permet de diminuer l'incidence des maladies cardiovasculaires, dont l'AVC, comparée à une alimentation « contrôle » (Estruch et al., 2013). En prenant en considération toutes les données de la littérature, l' « European Stroke Organisation » (ESO), et l' « *American Stroke Association* » (ASA) recommandent une alimentation riche en fruits, en légumes, en fibres, en produits laitiers (à faible teneur en lipides) et en poisson, ainsi que la réduction de l'apport de sodium et l'augmentation de celui du potassium (European Stroke Organisation Executive and Committee, 2008; Goldstein et al., 2006). Ces recommandations se sont basées sur une étude américaine qui proposait une nouvelle approche alimentaire pour prévenir et traiter l'hypertension, la diète DASH (pour *Dietary Approaches to Stop Hypertension*) (Appel et al., 1997). Fung *et al*. ont évalué l'association entre une diète de type DASH et l'incidence des maladies cardiovasculaires, dont l'AVC, sur une période de 24 ans, portant sur une cohorte de la *Nurses' Health Study* (Fung et al., 2008). Le résultat de cette étude montre que plus l'alimentation se rapproche de celle du DASH, plus le risque d'AVC diminue.

Le comportement alimentaire a donc un potentiel considérable sur la réduction de l'HTA et l'incidence de l'AVC (Appel et al., 2006). L'étude de la nutrition est généralement limitée, car les essais randomisés impliquant un suivi à très long-terme, sont difficilement

réalisables. Quant aux études épidémiologiques, elles doivent faire face à plusieurs défis, notamment des erreurs de mesure, certaines confusions, des variabilités au niveau des aliments et dans les groupes de référence, certaines interactions, et des analyses statistiques (Kamangar and Karimi, 2013). Tout en gardant ces limites à l'esprit, il est intéressant de noter que plusieurs aspects de l'alimentation ont été associés au risque d'AVC. Au moment de l'écriture de ce manuscrit, une recherche des termes « *Nutrition* » et « *Stroke* », sur PubMed, donne 2643 publications. Parmi ces publications, nous retrouvons quelques études précliniques et majoritairement des études épidémiologiques. Malgré un lien évident entre la nutrition et l'AVC, en terme de prévention, peu d'études se sont intéressées au potentiel de la nutrition sur les conséquences d'un AVC, alors qu'il existe un **lien bidirectionnel entre l'AVC et la nutrition**.

B. La nutrition après un AVC

1. Les troubles nutritionnels post-AVC

L'AVC provoque des **troubles nutritionnels**. En effet, le tiers des patients victimes d'un AVC présente une dénutrition à la phase aiguë de l'AVC (Davis et al., 2004). Au cours de l'hospitalisation, la prévalence de la dénutrition augmente. A l'admission en service de réadaptation, entre 30 et 50% des patients atteints d'AVC souffrent de dénutrition (Westergren et al., 2001). Une étude récente indique que deux semaines après leur admission, seulement 10% des patients arrivent à couvrir entièrement leurs besoins énergétiques et que 30% consomment moins de la moitié de ces mêmes besoins (Nip et al., 2011).

La dénutrition consiste en une inadéquation entre les apports nutritionnels et les besoins énergétiques. Cela peut être dû à une diminution des apports nutritionnels et/ou une augmentation des pertes (ou défaut d'absorption), et/ou une élévation des besoins (hypercatabolisme). Dans le cadre de l'AVC, il existe un hypercatabolisme entraînant une **dénutrition protéino-énergétique**. Elle résulte d'une augmentation des besoins et d'une diminution des apports. Ces patients sont le plus souvent incapables de répondre à cette augmentation des besoins. En effet, les atteintes fonctionnelles peuvent altérer la prise alimentaire, comme dans le cas d'une hémiplégie, d'une paralysie faciale, de troubles de la déglutition, et dans une moindre mesure, de troubles cognitifs tels que les troubles de l'émotion ou encore la dépression.

De nombreuses études montrent que la dénutrition est associée à une plus grande fréquence de complications et à une plus faible récupération fonctionnelle avec un pronostic

plus défavorable en phase et aiguë et subaiguë de l'AVC (Davalos et al., 1996; Yoo et al., 2008). Elle est également associée à une mortalité plus élevée et une durée d'hospitalisation plus longue (Davalos et al., 1996; Finestone et al., 1996). La principale cause de dénutrition est le trouble de déglutition. En effet, la présence de ce trouble lors de la phase aiguë de l'AVC est, elle aussi, associée à un allongement de la durée d'hospitalisation (Falsetti et al., 2009) ainsi qu'à une augmentation de la mortalité lors de la phase subaiguë (Smithard et al., 2007).

Face aux effets délétères d'un trouble nutritionnel, il est étonnant qu'il n'y ait eu que quelques rares études s'intéressant à l'effet d'une amélioration de la prise en charge nutritionnelle après un AVC.

2. Les études nutritionnelles post-AVC

En 2002, l'HAS recommandait qu'en l'absence d'alimentation orale, une alimentation par sonde naso-gastrique, adaptée à l'état nutritionnel, soit installée pour apporter un apport calorique suffisant au patient, dès la phase aigüe de l'AVC. Quelques études ont évalué les effets d'une **supplémentation nutritionnelle**, autrement dit la prise de compléments nutritionnels oraux (vitamine C ou protéines) pour lutter contre une carence chez les patients atteints d'AVC (Dennis et al., 2005; Gariballa et al., 1998b; Rabadi et al., 2008). Le seul bénéfice rapporté était une réduction de l'état de dénutrition (Gariballa et al., 1998b). En effet, aucun effet n'a été rapporté concernant le poids et les autres paramètres anthropométriques (Gariballa et al., 1998b), ni sur la mortalité, l'état fonctionnel, la durée d'hospitalisation ou la qualité de vie (Dennis et al., 2005; Gariballa et al., 1998b).

Ce n'est que très récemment qu'une amélioration de la prise en charge nutritionnelle a été évaluée dans le cadre de l'AVC. Les premières études se sont focalisées sur le **déficit protéino-énergétique** délétère après un AVC (Ha et al., 2010; Nip et al., 2011). En effet, les études, expérimentales et chez l'Homme, montrent que durant un AVC, la synthèse protéique cérébrale est extrêmement altérée et l'inhibition de la synthèse protéique est corrélée avec la taille de la zone ischémique (Aquilani et al., 2011). Les patients recevant une alimentation dite « hyperprotéinée » (+10% protéines) et hypercalorique durant 21 jours ont une meilleure récupération fonctionnelle que les patients recevant un placebo (Aquilani et al., 2008). De plus, il existe une corrélation positive entre l'amélioration spontanée des troubles neurocognitifs et l'augmentation de l'apport protéique alimentaire (Aquilani et al., 2008). Ainsi, une supplémentation nutritionnelle permettrait d'améliorer la récupération

fonctionnelle des patients atteints d'AVC ischémique, en phase subaiguë. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cet effet bénéfique de la supplémentation nutritionnelle en protéine. L'augmentation de la biodisponibilité en acides aminés au cerveau permettrait (1) la stimulation de la synthèse protéique, (2) l'amélioration de la production d'énergie par les neurones, en utilisant les acides aminés comme substrat énergétique au lieu du glucose dans le cycle de Krebs et (3) une meilleure synthèse des neurotransmetteurs (Aquilani et al., 2011).

Une autre approche nutritionnelle a été employée pour lutter, non pas contre le déficit protéino-énergétique, mais contre le stress oxydatif, suite à l'AVC, par une supplémentation en vitamines. Les **vitamines** des groupes D, B, C et E ont notamment fait l'objet de ce genre d'études, mais toutes n'ont pas eu le succès escompté.

L'ischémie cérébrale stimule l'expression et l'activation du récepteur de la **vitamine D**, indiquant un rôle potentiel de la vitamine D dans le système endocrinien des patients atteints d'AVC (Ridder et al., 2009). Des études expérimentales ont permis de révéler l'effet neuroprotecteur d'un traitement préventif à la vitamine D, dans un modèle d'AVC chez le rat (Wang et al., 2000). Dans un modèle d'AVC murin, cet effet neuroprotecteur a été retrouvé avec une supplémentation nutritionnelle en vitamine D (Ekici et al., 2009). Cette neuroprotection de la vitamine D proviendrait partiellement de la modulation de la réponse inflammatoire et du stress oxydatif, par son rôle neurotrophique (Ekici et al., 2009), mais également par son action sur l'homéostasie calcique. Au niveau clinique, un des objectifs majeurs du traitement de l'AVC est la récupération des déficits moteurs. Dans un essai randomisé sur une centaine de patients hémiplégiques suite à un AVC, l'administration de la vitamine D permet d'améliorer significativement la force musculaire des patients, conduisant à une diminution du risque de fracture du col du fémur (Sato et al., 2005). Ainsi, un apport suffisant de vitamine D peut être bénéfique pour la fonction neuromusculaire chez les patients victimes d'un AVC. A noter que la déficience en vitamine D est associée à un facteur de risque d'AVC. La supplémentation en vitamines, notamment du groupe B et C, a un effet positif sur les marqueurs biologiques, mais son efficacité clinique reste encore controversée (Rabadi and Kristal, 2007; van Overbeek et al., 2013).

Une autre piste nutritionnelle est la **supplémentation en oligo-éléments**, notamment en **zinc** et en **magnésium**. Le zinc joue un rôle capital dans le fonctionnement cérébral en raison de son activité spécifique de médiateur neuronal, en plus de ses propriétés catalytiques et structurelles bien connues. Cependant, l'excès comme le déficit en zinc sont délétères pour

la fonction cérébrale, et les résultats des études d'intervention utilisant, soit des chélateurs de zinc, soit à l'inverse des supplémentations en zinc sont conflictuels (Aquilani et al., 2011). Concernant le Mg^{2+}, aucun des essais cliniques réalisés jusqu'à aujourd'hui n'a montré de bénéfices sur la récupération fonctionnelles post-AVC (Kidd, 2009; Westermaier et al., 2013).

A l'heure actuelle, seulement deux nutriments ont des bénéfices avérés dans la récupération fonctionnelle post-AVC : la **citicoline** et la **glycérophosphocholine (GPC)**, tous deux dérivés de l'acide aminé choline. La citicoline (ou cytidine-diphosphate-choline) est un intermédiaire de la biosynthèse des phosphatidylcholines (des phospholipides essentiels aux membranes biologiques). Ce nucléotide, qui est une forme activée de la choline, est un complément alimentaire stimulant et ionotropique de type cholinergique (récepteur de l'acétylcholine impliqué dans la jonction neuro-musculaire). La citicoline est bien absorbée par voie orale, et après l'absorption par l'endothélium intestinal, elle est hydrolysée en choline et cytidine, qui entrent dans la circulation sanguine et traversent la BHE. Des études ont été menées pour évaluer l'effet de la supplémentation nutritionnelle en citicoline sur les conséquences de l'AVC ischémique. Quatre essais randomisés et contrôlés ont été réalisés (Clark et al., 1997; Clark et al., 2001; Clark et al., 1999; Warach et al., 2000). En 2002, une méta-analyse des résultats obtenus par ces 4 études a été effectuée (Davalos et al., 2002). Dans tous les cas, la citicoline a été administrée dans les 24 premières heures après l'accident et ce durant 6 semaines, et l'efficacité de la supplémentation a été évalué 3 mois après l'AVC. La citicoline est associée significativement à une meilleure récupération globale 3 mois après l'AVC. Cette méta-analyse a pu mettre en évidence une augmentation de la probabilité d'autonomie dans les activités de la vie quotidienne de 29% et celle de récupérer des troubles fonctionnels de 42%. Mais aucun bénéfice n'a été observé sur la survie 3 mois après l'AVC (Davalos et al., 2002). La citicoline entraîne des effets secondaires, tels que l'anxiété et des œdèmes au niveau des jambes. A l'heure actuelle, une étude clinique randomisée et contrôlée est menée pour confirmer ces résultats (Bolland et al., 2009).

Tout comme la citicoline, le GPC est une source de choline hautement absorbée et biodisponible. Le GPC a été administré à près de 3000 patients atteints d'un AVC au travers de 5 essais cliniques, utilisant le même protocole (Kidd, 2009). L'administration du GPC a débuté dans les 10 jours suivants l'AVC et a duré 6 mois. Les essais comprenaient deux phases, la première durait 28 jours où le GPC était administré en intramusculaire, la deuxième phase s'arrêtait au 180ème jour post-AVC et l'administration se faisait par voie orale en complément alimentaire. A la fin des 6 mois d'études, le GPC améliorait significativement le

score de plusieurs tests évaluant la récupération fonctionnelle, et plus particulièrement la récupération cognitive des patients (Barbagallo Sangiorgi et al., 1994). Une méta-analyse a confirmé que le GPC améliore significativement la récupération d'un AVC ischémique (Parnetti et al., 2001). Le GPC est actuellement utilisé en Europe pour traiter les lésions cérébrales, dont les AVC (Parnetti et al., 2001).

Hormis ces quelques études, la nutrition n'a pas fait l'objet d'études interventionnelles, alors qu'elle semble posséder un potentiel considérable sur la récupération fonctionnelle après un AVC. De plus, seule la supplémentation en protéines a été étudiée. Or les lipides pourraient également être intéressants. En effet, une étude sur une cohorte de patients victimes d'attaque cardiaque montre qu'un IMC élevé est associé à une réduction de risque de mortalité (Fonarow et al., 2007). Cette association est également retrouvée dans le cadre de l'AVC (Scherbakov et al., 2011). Ce phénomène est appelé le « **paradoxe de l'obésité** », car l'obésité est facteur de risque d'AVC mais permet une meilleure chance de survie en cas d'AVC. D'autres facteurs de risque d'AVC sont liés aux lipides, notamment la carence en AGPIs ω-3. Ces lipides ont également des propriétés qui pourraient être bénéfiques dans la lutte contre l'AVC.

C. Les acides gras polyinsaturés ω-3 et l'AVC

1. Les deux familles d'AGPIs : les ω-3 et les ω-6

Environ 90 % des graisses alimentaires se présentent sous la forme de triglycérides et sont composées d'acides gras (AG) (au nombre de 3) et de glycérol. Les AG sont composés d'atomes de carbone qui forment une chaîne aux extrémités de laquelle se trouve, d'une part, un groupement méthyle (CH_3^-) et d'autre part, un groupement acide (COOH). Un AGPI est un AG dont la chaîne comporte plusieurs doubles liaisons carbone-carbone. Comme mentionné précédemment, les AGPIs forment deux familles distinctes de lipides, **les oméga-6 (ω-6)** et **les oméga-3 (ω-3)**. Le terme « oméga » désigne le carbone du groupement méthyle, et le chiffre (3 ou 6) désigne la position de la première double liaison à partir de ce carbone ω (figure 15). La désignation biochimique de ces AGPI est de type **Cx : y ω-3**, où x représente le nombre d'atomes de carbone et y le nombre de doubles liaisons. Si nous prenons l'exemple de l'acide α-linolénique (ALA), un oméga-3, sa désignation biochimique est C18 :3 ω-3 et celle de l'acide linoléique (LA), un oméga-6, C18 :2 ω-6 (figure 15).

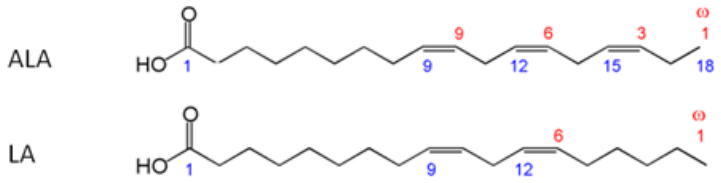


Figure 15 : L'acide α-linolénique (ALA ; C18 :3 ω-3) et l'acide linoéique (LA ; C18 :2 ω-6). En bleu le numéro de l'atome de carbone en partant du carbone α et en rouge le numéro de l'atome de carbone en partant du carbone ω.

Les mammifères sont incapables de synthétiser l'acide linoléique (LA ; C18 :2 ω-6) et l'acide α-linolénique (ALA ; C18 :3 ω-3), les précurseurs respectifs des AGPIs ω-6 et ω-3. Ils sont dits « essentiels », par analogie aux acides aminés essentiels. Ces AGPIs doivent donc être apportés par l'alimentation (Holman, 1964). Dans l'organisme, les AGs peuvent être intégrés dans les membranes, stockés dans les tissus, métabolisés, ou encore oxydés. Le métabolisme du LA conduit notamment à la production de **l'acide arachidonique** (AA ; C20 :4 ω-6) et de l'acide docopentaénoïque (C22 :5 ω-6), et celui de l'ALA à celle de **l'acide eicosapentaénoïque** (EPA ; C20 :5 ω-3) et **l'acide docohexaénoïque** (DHA ; C22 :6 ω-3) (figure 16). La bioconversion de l'ALA en EPA et DHA est extrêmement faible chez

l'Homme, c'est pourquoi ces ω-3 à longue chaîne (ω-3 à LC) sont aussi considérés comme essentiels, et doivent être apportés par l'alimentation (Brenna et al., 2009).

Les ω-6 sont particulièrement abondants dans les huiles de tournesol, de soja, de pépin de raisin ou de maïs (principales sources de LA), les viandes, les volailles grasses, les œufs ou encore le beurre (principales sources d'AA). Les ω-3 sont surtout présents dans les huiles de noix, de soja et de colza (principales sources d'ALA) et les poissons gras, tels que le saumon, le thon, la sardine, le maquereau ou le hareng (principales sources d'EPA et de DHA).

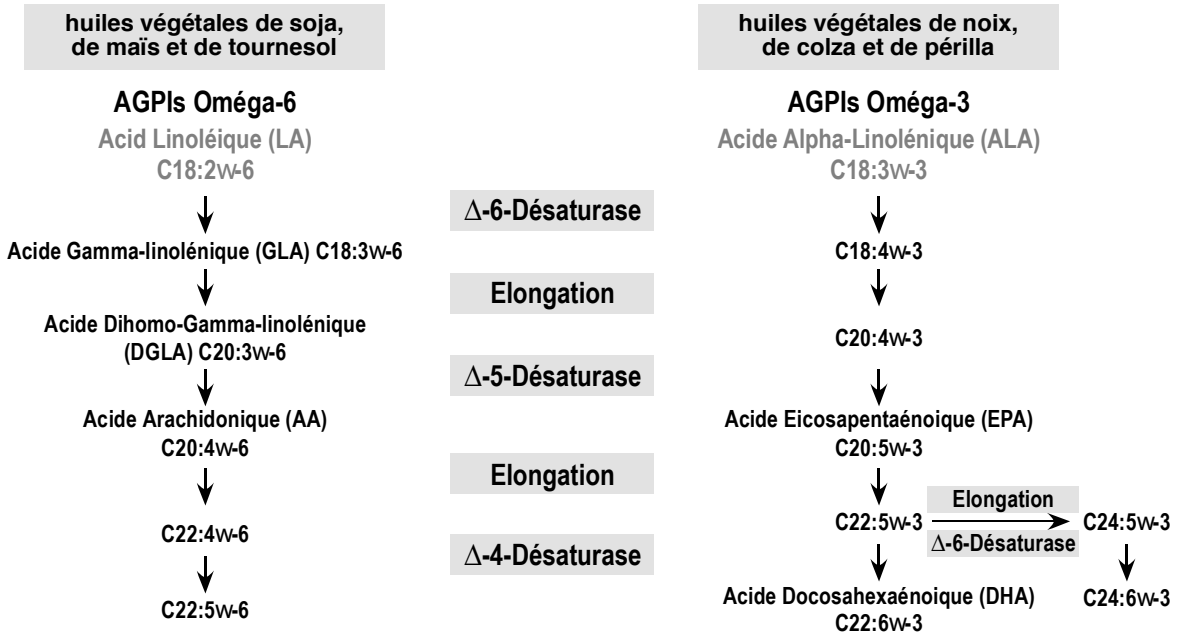


Figure 16 : Biosynthèse des AGPI ω-6 et ω-3, d'après (Nguemeni et al., 2013).

Dans le corps humain, le métabolisme des acides LA et ALA utilisent les mêmes enzymes, dont l'enzyme delta 6-désaturase (figure 16). Il existe une compétition entre ces deux familles d'AGPIs pour ces différentes enzymes. Ceci est d'autant plus important que les ω-6 et des ω-3 ont des effets opposés dans certains processus physiologiques, notamment la **réponse inflammatoire**.

Les AGPIs jouent un rôle important dans le système immunitaire. La famille des éicosanoïdes est le lien entre les acides gras et l'inflammation. Les éicosanoïdes constituent une vaste famille de dérivés d'oxydation des AGPIs à 20 atomes de carbone, comme l'acide dihomo-γ-linolénique (DGLA ; C20 :3 ω-6), l'AA (C20 :4 ω-6) et l'EPA (C20 :5 ω-3). On distingue deux types d'éicosanoïdes : les leucotriènes (LT) et les prostanoïdes. Ces derniers

comprennent les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX) et les prostacyclines (PGI). Tous ces éicosanoïdes ont un rôle dans la réponse inflammatoire.

Chez l'Homme consommant un régime occidental classique, environ 20% des acides gras composant les membranes lipidiques des cellules inflammatoires sont des AGPIs ω-6, et plus particulièrement l'AA (Gibney and Hunter, 1993). La proportion des autres AGPIs à 20 carbones est nettement plus faible. En effet, le DGLA représente 2% et l'EPA moins d'1% des AGs totaux (Gibney and Hunter, 1993). L'AA, présent dans les membranes lipidiques, est le substrat le plus communément utilisé pour la synthèse d'éicosanoïdes.

La métabolisation de l'AA par une cyclo-oxygénase (COX) entraîne la formation de prostanoïdes de série-2, notamment les notamment PGD_2 et PGE. PGD_2 est d'ailleurs la prostaglandine la plus abondante dans le cerveau (Abdel-Halim et al., 1977). Ses rôles physiologiques incluent notamment une activité anti-agrégante et régulatrice du métabolisme cérébral qui sous-tendraient un rôle protecteur contre les accidents ischémiques. Celui-ci a été démontré dans des modèles murins d'ischémie cardiaque et cérébrale (Katsumata et al., 2014) (Saleem et al., 2007). L'activation pharmacologique de son récepteur DP1 a même été proposée comme piste thérapeutique dans l'AVC (Saleem et al., 2007). En revanche, PGE_2 a de nombreux effets pro-inflammatoires. Elle induit de la fièvre, une vasodilatation, et augmente la perméabilité vasculaire. PGE_2 induit l'expression de COX-2, et favorise donc sa propre production. Elle induit également la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6, par les macrophages (Bagga et al., 2003).

L'AA peut aussi être métabolisé par la lipoxygénase-5 (LOX-5), ce qui entraîne la production de leucotriènes de série-4. Ces derniers sont des bronchoconstricteurs, augmentent la perméabilité vasculaire, et possèdent un pouvoir chimio-attractant leucocytaire. Ils induisent également la libération d'enzymes lysosomales, et favorisent la production de ROS et de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β et IL-6) (Calder, 2006). Chez les patients atteints de pathologies inflammatoires aiguës et chroniques, des niveaux élevés de ces éicosanoïdes sont observés dans les tissus, mais aussi dans le sang. L'AA peut également être métabolisé par la lipoxygénase-12/15, présente au niveau cérébral et impliquée dans la dégradation des organites cellulaires, dont la mitochondrie (van Leyen et al., 1998). L'étude des modèle murins d'AVC montre que cette enzyme est surexprimée après l'AVC et que son inhibition pharmacologique et génique réduit les dommages cérébraux normalement induit par l'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (van Leyen et al., 2006).

Les ω-6 et plus particulièrement l'AA, vont favoriser une réponse pro-inflammatoire lors d'une agression de l'organisme. C'est pourquoi, l'AHA et d'autres scientifiques ont jugé qu'il était crucial de différencier les AGPIs ω-6 (LA, DGLA, et AA) des ω-3, car les différents AGs ont des propriétés, des fonctions et des effets biologiques différents sur la santé humaine (Calder and Deckelbaum, 2011).

Une consommation plus importante d'huiles de poissons gras permet d'augmenter la proportion des AGPIs ω-3 à LC (EPA et DHA) dans les membranes lipidiques des cellules immunitaires, au détriment de l'AA (Gibney and Hunter, 1993). De plus, cette supplémentation est associée à une réduction de la production de PGE_2 (Endres et al., 1989), et de LT de série-4 (Lee et al., 1985; von Schacky et al., 1993) par les cellules inflammatoires. L'EPA est également un substrat des enzymes COX et LOX, et permet la production de différentes familles d'éicosanoïdes : les PGs et TXs de série -3 et les LTs de série -5. Les PGE_3 vont neutraliser les PGE_2. Chez l'Homme, une supplémentation en huile de poisson gras permet d'augmenter la production des leucotriènes de série-5 (Lee et al., 1985), et des prostaglandines PGE_3 (Hawkes et al., 1991). Mais ces médiateurs inflammatoires formés à partir de l'EPA sont beaucoup moins puissants que ceux formés par l'AA. Par exemple, le LTB_5 est entre 10 et 100 fois moins chimioattractant que le LTB_4 (Lee et al., 1984), et l'action de PGE_3 sur l'induction de l'expression de COX-2 et la production de l'IL-6 est plus faible que celle de PGE_2 (Bagga et al., 2003). En plus de la génération de différents éicosanoïdes, l'EPA permet la génération d'autres médiateurs, appelés les résolvines E (E pour EPA), toujours par l'intermédiaire de COX-2 et LOX (Serhan et al., 2000). De même, le DHA permet la production de résolvines, de type D (D pour DHA), mais également d'autres médiateurs, tels que des docosatriènes et des neuroprotectines, tous produits par les enzymes COX-2 et LOX. Tous ces médiateurs provenant des ω-3 à LC ont des effets anti-inflammatoires (Hong et al., 2003; Mukherjee et al., 2004).

Les effets anti-inflammatoires des ω-3 à LC ne passent pas uniquement par la modification de la production des éicosanoïdes. En effet, une étude a montré que, lors d'un épisode inflammatoire sur des cellules endothéliales humaines, le DHA diminue significativement l'expression d'E-sélectines, ICAM-1 et de VCAM-1, et empêche l'adhésion leucocytaire (De Caterina and Libby, 1996). Les mêmes expériences ont été menée avec l'EPA ; il inhibe également l'adhésion leucocytaire (Kim et al., 1990). Une supplémentation en huile de poisson permet, chez la souris, de réduire l'expression d'ICAM-1 sur la surface

des macrophages (Miles et al., 2000) et diminue également les niveaux de VCAM-1 solubles chez l'Homme (Miles et al., 2001). De plus, l'EPA et le DHA inhibent la production de TNF-α et d'IL-1β par les monocytes (Novak et al., 2003), et la production d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules endothéliales (Khalfoun et al., 1997). Une supplémentation nutritionnelle en huile de poisson, chez des volontaires sains, entraînerait une réduction de la production de ces différentes cytokines par les cellules inflammatoires (Trebble et al., 2003; Wallace et al., 2003), néanmoins ces résultats restent controversés (Calder, 2003).

L'inflammation cérébrale étant une composante majeure de l'AVC, des études ont évalué l'effet des ω-3 à LC sur la neuroinflammation post-ischémique. Certaines études ont évalué les effets d'une supplémentation nutritionnelle en DHA (0,7g pour 100g de croquettes) par rapport à un apport carencé en ω-3, durant 12 semaines, sur l'inflammation après une MCAo de 60 minutes chez le rongeur. En comparaison avec le régime déficient, les animaux supplémentés en DHA présentent une augmentation de la quantité de DHA dans le striatum qui est associée à la réduction de la taille de l'infarctus cérébral, de l'activation microgliale et de l'expression protéique de COX-2, IL-6 et IL-1β (Lalancette-Hebert et al., 2011). Ces effets neuroprotecteurs et anti-inflammatoires ont été retrouvés avec une approche dite « médicamenteuse ». En effet, toujours chez le rongeur, des injections journalières de DHA (500 nmol/kg) en injection intra-péritonéale (i.p), durant les 3 jours précédant l'ischémie, permettent de réduire la taille de la lésion cérébrale, le marquage de la microglie, des neutrophiles et des macrophages, et enfin l'expression génique de TNF-α, d'IL-1β et d'IL-6 (Chang et al., 2013). En post-traitement 3 heures après une MCAo de 2h, une injection *i.v* de DHA (5mg/kg) réduit efficacement les dommages neuronaux, l'altération de la BBB et des déficits fonctionnels (Eady et al., 2012; Hong et al., 2014; Hong et al., 2015). De même, après 4 semaines d'injections journalières d'EPA (500mg/kg en i.p, représentant ~ 3300 fois la dose de 500nmol/kg), les animaux présentent un protection au niveau de l'hippocampe et une réduction de l'activation microgliale (Okabe et al., 2011). Des résultats similaires ont été obtenus par mon laboratoire d'accueil. En effet, une injection de DHA ou d'ALA (500nmol/kg en *i.v*), 3 jours avant une ischémie globale, permet d'obtenir une protection des neurones hippocampiques (Blondeau et al., 2002). Pour tendre vers l'approche pharmacologique, comme thérapeutique, certains se sont intéressés aux effets de ces ω-3 sur l'inflammation, en post-ischémie. Chez le rat, l'injection *i.v* de DHA, 1 h après une ischémie cérébrale de 2 h, est neuroprotectrice (Belayev et al., 2009). Cette neuroprotection est

accompagnée d'une réduction du marquage de la microglie et des macrophages (Belayev et al., 2011).

Les bénéfices observés lors de traitement par les ω-3 à LC pourraient être dus à leur conversion par des processus d'oxydation en résolvines, composé lipidiques oxygénés capables de réduire la réponse inflammatoire (Serhan, 2014). En effet, l'équipe du Pr. Bazan a décrit que l'injection de DHA conduisait à une production non-négligeable d'une résolvine capable de protéger les neurones d'un AVC, qu'il a nommé en conséquence neuroprotectine D1 (ou protectine D1 – PD1)–(Belayev et al., 2011). L'effet neuroprotecteur de la neuroprotectine D1 serait supporté par son effet anti-inflammatoire et anti-apoptotique démontré *in vitro* et *in vivo*. Son injection en *i.v*, 1h après l'ischémie permet une réduction plus importante de l'infarctus cérébral à dose égale à celle de l'injection du DHA (Bazan et al., 2012). Cela a conduit à l'hypothèse du professeur Bazan que ces bénéfices ne soient pas dus directement à ces AGPIs ω-3 à LC mais à leurs dérivés oxygénés.

L'intérêt grandissant pour ces dérivés, un isomère de la neuroprotectine D1, la protectine DX (PDX) a été caractérisé par l'équipe du professeur Guichardant (Chen et al., 2009; Chen et al., 2011). Tout comme la PD1, PDX est une résolvine capable d'inhiber les COX-1 et 2 et semble exercer ces propriétés à doses plus faibles. De plus, celle-ci exerce aussi un effet inhibiteur sur la production des ROS par les neutrophiles (Liu et al., 2014). Il serait donc intéressant d'étudier le potentiel neuroprotecteur de PDX dans le cadre de l'AVC.

Enfin, il existe un autre type de résolvine dérivé du DHA, produits par les macrophages nommé Marésine (Bazinet and Laye, 2014). L'injection i.c.v de la Marésine1 réduit significativement le volume de l'infarctus cérébral et les déficits neurologiques des animaux après une MCAo (Xian et al., 2016). Ces bénéfices sont encore liés à l'effet anti-inflammatoire des résolvines, la Marésine1 réduisant l'activation du facteur de transcription NFKB.

En résumé, *via* la nutrition ou un traitement par injections, les ω-3 auraient des propriétés anti-inflammatoires, les ω-6 seraient, quant à eux, pro-inflammatoires et donc néfastes dans les maladies inflammatoires, telles que l'AVC (De Lorgeril, 2007; Ghosh et al., 2007).

Dans les pays occidentaux, la société et l'industrialisation ont énormément contribué à l'évolution de l'alimentation. En effet, au cours du siècle passé, les apports en ω-6 ont augmenté, alors que les apports en ω-3 ont diminué, parallèlement à l'augmentation des

maladies cardiovasculaires, dont l'AVC. C'est à partir de ces observations que le concept de **ratio « idéal » ω-6/ω-3** dans l'alimentation est né (Simopoulos, 2008). Le ratio ω-6/ω-3 est d'environ 16 :1 pour le régime dit « occidental », autrement dit il apporte 16 fois plus d'ω-6 que d'ω-3. Une quantité excessive d'ω-6 et un ratio ω-6/ω-3 élevé, caractéristiques de notre alimentation, favoriseraient la pathogenèse des maladies cardiovasculaires, inflammatoires, des cancers ou encore des maladies auto-immunes, alors qu'une augmentation de l'apport en ω-3, réduisant ainsi le ratio, empêcherait leur apparition (Simopoulos, 2008). D'autres études épidémiologiques vont dans ce sens : pour prévenir ces différentes pathologies, nous devrions consommer au maximum 5 fois plus d'ω-6 que d'ω-3 (Simopoulos, 2008), ce sont d'ailleurs les recommandations de toutes les agences sanitaires mais également de l'OMS (World Health Organization, 1995). Mais l'importance de ce ratio ω-6/ω-3, en comparaison avec à un apport déterminé, est sujet à controverse. A l'heure actuelle, le manque de connaissances plus approfondies concernant le ratio pourrait porter préjudice à l'importance d'augmenter l'apport absolu en AGPI ω-3, qui est clairement bénéfique, en particulier sur la santé cardiovasculaire (Stanley et al., 2007). Il est peut-être encore trop tôt pour conclure définitivement sur l'utilité du ratio ω-6/ω-3 pour la santé en général. Néanmoins, une vision plus intégrative qui différencierait les ω-6 (LA et AA) et les ω-3 (ALA, EPA et DHA) est nécessaire (Nguemeni et al., 2013).

Le rôle des AGPIs ω-3 à LC, et plus particulièrement de l'EPA et du DHA, dans la prévention des maladies cardiovasculaires et neuro-dégénératives, a fait l'objet de nombreux travaux de recherche, tant du point de vue clinique que fondamental.

2. L'intérêt des AGPIs ω-3 à LC au niveau cardiovasculaire et cérébral

La convergence des résultats issus des laboratoires, des études cliniques et des enquêtes épidémiologiques a permis de préciser le rôle des AGPIs ω-3 à LC dans la physiologie cérébrale et cardiovasculaire.

a) Les AGPIs ω-3 au niveau cardiovasculaire

Dans le cas des maladies cardiovasculaires, le rôle des graisses alimentaires a longtemps été diabolisé (Kuller, 2011; Willett, 2011). L'objectif initial était de réduire l'apport de matière grasse totale, mais aujourd'hui l'accent est mis sur la qualité des lipides. Dans cette optique, les effets bénéfiques potentiels des AGPIs ω-3 sur la santé font l'objet d'un intérêt considérable depuis les années 1970, lorsque des études épidémiologiques sur les

Inuits du Groenland ont établi que cette population avait un taux d'infarctus du myocarde nettement inférieur à celui des pays occidentaux (Bang et al., 1971; Dyerberg et al., 1975; Dyerberg et al., 1978). Ces observations ont été associées à une forte consommation d'EPA et de DHA, un enrichissement des lipides sanguins en AGPIs ω-3 à LC, et une réduction des TG à jeun (Bang et al., 1971; Dyerberg et al., 1975; Dyerberg et al., 1978). Après la publication de ces résultats, de nombreuses études prospectives de cohortes ont été menées sur la consommation de poissons et les maladies cardiovasculaires. La majorité de ces études a montré un effet protecteur. En 1999, une revue incluant 11 études portant au total sur plus de 110000 individus, a été publiée (Marckmann and Gronbaek, 1999). Les auteurs ont conclu qu'une consommation de 40-60g de poissons par jour est associée à une réduction significative de la mortalité, seulement dans les populations à risque élevé de maladies cardiovasculaires. Pour permettre d'établir les apports journaliers recommandés (AJR), les effets de l'EPA et du DHA sur les personnes généralement en bonne santé ont été évalués. Une méta-analyse a permis d'identifier que les apports de 500 mg/jour d'EPA+DHA permettent la meilleure protection contre les maladies cardiovasculaires (Harris et al., 2008a). Ainsi, aux Etats-Unis, l'AHA recommande un apport journalier d'au moins 500 mg/jour d'EPA+DHA, et d'1 g/jour chez les personnes à risque de maladies cardiovasculaires. En France, l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation (ANSES) recommande également 500 mg/jour d'EPA et de DHA.

Des épidémiologistes d'Harvard ont examiné les habitudes alimentaires et l'incidence des différents AVC sur près de 80 000 infirmières (âgées de 30 à 55 ans), sur 14 ans. La consommation de poissons, au moins deux fois par semaine, est associée à une réduction significative des AVC ischémiques (Iso et al., 2001). Une méta-analyse de 15 études observationnelles reporte qu'une augmentation de la consommation de poissons (3 fois par semaine) est associée à une réduction de 6% du risque de survenue d'AVC (Larsson and Orsini, 2011). Si la supplémentation en AGPIs ω-3 à LC est clairement bénéfique au niveau cardiovasculaire, il n'en est pas de même pour le risque d'AVC. En effet, un essai randomisé sur 2501 patients n'a montré aucun impact d'une supplémentation quotidienne en EPA/DHA (600 mg/jour) sur le risque de survenue d'AVC (Galan et al., 2010). En revanche, une étude observationnelle, sur plus de 20 000 néerlandais, a montré qu'un apport important en AGPI ω-3 végétal, l'ALA, permet de réduire l'incidence de l'AVC (de Goede et al., 2011).

b) Les AGPIs ω-3 au niveau cérébral

Un apport journalier adéquat en DHA et en EPA est fondamental pour le développement, la fonction et le déclin cérébral. Ces ω-3 à LC interviennent dans toutes les étapes de la vie. Durant le dernier trimestre de la vie fœtale et les deux premières années de l'enfance, le cerveau croît extrêmement rapidement (McCann and Ames, 2005). L'étude épidémiologique appuyant cette hypothèse est celle de la « *Dutch Hunger Winter* » (la famine de l'hiver de 1944 en Allemagne). Cette étude a montré une augmentation de l'incidence de la schizophrénie chez les personnes, dont les mères ont été exposées à la famine durant leur grossesse (Susser et al., 1996). Le DHA est un des nutriments absolument indispensables au bon développement sensoriel, cognitif et moteur durant cette croissance rapide du cerveau (McCann and Ames, 2005). Les neurones sont formés d'axones et d'extension dendritiques. Pour une croissance de ces extensions, les membranes des neurones doivent être relativement fluides, et le DHA est l'élément le plus fluidifiant dans les membranes cellulaires. Les synapses, qui sont la base des circuits neuronaux, sont d'ailleurs formées de membranes préférentiellement enrichies en DHA (Breckenridge et al., 1972). De même, la rétine qui est une extension fonctionnelle du cerveau, contient des cellules dont les membranes sont les plus fluides, en comparaison des autres cellules de l'organisme. Ces cellules sont également riches en DHA. Expérimentalement, les carences en ω-3 entraînent des déficits dans la structure de la rétine, le développement de l'acuité visuelle, et la cognition (Crawford, 1993; Neuringer et al., 1986; Reisbick et al., 1997).

La revue de McCann et Ames conclut que : (1) chez les animaux dont les concentrations cérébrales en DHA ont été sévèrement réduites, une supplémentation nutritionnelle en DHA permet de restaurer les niveaux de performance ; (2) les études chez les nourrissons humains, dans les limites imposées par les essais, suggèrent qu'une supplémentation en DHA améliore le développement neuro-moteur et (3) qu'il existe une association positive entre l'allaitement maternel et les performances cognitives du nourrisson.

Au-delà de jouer un rôle dans le développement cérébral, de nombreuses études précliniques et cliniques suggèrent que la consommation d'huiles de poissons riches en AGPI ω-3 à LC est associée à la réduction du risque d'altération de la fonction cognitive (Bouzan et al., 2005; Kurth et al., 2006; Mozaffarian et al., 2005). Malheureusement, un essai clinique très récent rapporte qu'une supplémentation en AGPI ω-3 à longue chaîne (1g/jour pendant 5 ans) n'a aucun impact sur le déclin cognitif chez les personnes souffrant d'Alzheimer (Chew

et al., 2015). Cet essai a été mené sur une population âgée (73 ans de moyenne d'âge) présentant un déclin cognitif intermédiaire ou avancé. Le déclin cognitif étant un processus évoluant sur des décennies, une supplémentation à court-terme apportée trop tardivement pourrait ne pas être efficace. De plus, les études cliniques sont généralement trop courtes (0,5-2% de l'espérance de vie) par rapport aux modèles animaux (10 à 50% de l'espérance de vie). D'autre part, aucun marqueur biologique n'a été mesuré chez ces patients. Or, de faibles niveaux de DHA ont été détectés dans le plasma et dans le cerveau des patients souffrant d'Alzheimer (Lin et al., 2012). Néanmoins, si aucune étude clinique ne montre qu'une supplémentation n'a aucun effet sur la prévention du déclin cognitif, il semblerait qu'une déficience en AGPIs ω-3 à LC soit néfaste dans ce contexte. Aujourd'hui, il est clairement établi que les AGPIs ω-3 à LC, plus particulièrement le DHA, sont essentiels pour la cognition, le comportement et l'humeur, ainsi que pour le développement cérébral. Ces différents effets bénéfiques des AGPI ω-3 à LC peuvent s'expliquer par les différents effets biologiques qu'exerce cette famille d'acides gras. En effet, les ω-3 jouent un rôle dans plusieurs facteurs de risque des maladies cardiovasculaires.

c) Les AGPIs ω-3 à LC et les facteurs de risque d'AVC

L'hypertension artérielle est le premier facteur de risque des maladies cardiovasculaires, dont l'AVC. Or, plusieurs études ont montré que des doses suffisamment élevées d'AGPI ω-3 à LC sont associées à des réductions modestes de la pression artérielle systémique (Morris et al., 1993). Ces effets sont observés chez des individus âgés d'au moins 45 ans et souffrant d'hypertension, et nécessitent des doses d'au moins 3g/jour d'ω-3 à LC (Geleijnse et al., 2002). Les mécanismes sous-jacents pourraient être une réduction de la production de la thromboxane A_2 (un vasoconstricteur), une augmentation de la synthèse de NO (un vasodilatateur), ou encore l'amélioration de la réactivité vasculaire (Mori and Woodman, 2006). La légère diminution, de 0,66 mm Hg et de 0,35 mm Hg de la pression systolique et diastolique, respectivement, par gramme d'AGPIs ω-3 à LC consommé, à partir d'huile de poisson, pourrait en partie expliquer les effets bénéfiques de ces AGPI ω-3 à LC sur les maladies cardiovasculaires (Morris et al., 1993). Compte tenu de la difficulté pratique à apporter des concentrations aussi élevées d'ω-3 à LC (environ 4g/jour) et de la disponibilité de plusieurs médicaments efficaces pour traiter l'hypertension, cette approche a été délaissée.

La dyslipidémie est définie comme étant une concentration anormale de lipides dans le sang, et plus particulièrement de cholestérol VLDL (cholestérol des lipoprotéines de très

faible densité), et c'est également un facteur de risque des maladies cardiovasculaires, dont l'AVC. Les AGPI ω-3 jouent un rôle important dans la régulation des gènes cruciaux pour le contrôle de l'homéostasie lipidique. Chez l'Homme, les ω-3 à LC permettent de réduire la concentration des triglycérides dans le plasma (Kris-Etherton et al., 2002). Cela est obtenu grâce à la réduction de la synthèse hépatique des triglycérides et une augmentation de la clairance des triglycérides circulants (Harris et al., 2008b). De plus, les AGPIs ω-3 pourraient promouvoir la β-oxydation, la principale voie catabolique des acides gras, ce qui réduit le disponibilité du substrat de la synthèse des triglycérides (Sampath and Ntambi, 2005). Pour obtenir ces résultats, des doses de 2 à 4g d'AGPI ω-3 à LC sont nécessaires. Ces doses entraînent une réduction de la concentration des triglycérides de 30%. Un tel apport en ω-3 ne peut être facilement obtenu par l'alimentation. Une supplémentation nutritionnelle est donc nécessaire.

Les AGPIs ω-3 à LC agissent sur **l'agrégation plaquettaire** et la **fonction endothéliale**. Les cellules endothéliales, formant la barrière entre le sang et les cellules musculaires lisses des artères, produisent plusieurs substances vasoactives. Certaines favorisent la vasoconstriction (TXA_2, et PGH_2), et d'autres la vasodilatation (PGI_2 et NO) (Flammer and Luscher, 2010). Des expériences sur les artères coronaires porcines montrent qu'un traitement à long terme avec des huiles de poisson a un effet vasodilatateur. L'EPA serait principalement responsable de cette vasodilatation (Shimokawa and Vanhoutte, 1989). L'EPA augmente la vasodilatation par le NO et par le facteur endothélial hyperpolarisant (Tagawa et al., 2002). Quant au DHA, il modifie les cavéoles, qui sont des invaginations de la membrane plasmique (une sorte de radeaux lipidiques), en modifiant la composition des membranes lipidiques et la distribution des protéines de structure. Il augmente également l'activité d'eNOS dans des cellules endothéliales humaines, et donc la production de NO (Li et al., 2007). Ce NO inhibe l'agrégation et l'adhésion plaquettaire, ainsi que l'adhésion des leucocytes. De plus, les AGPI ω-3 à LC diminuent le risque de thrombose, en inhibant l'agrégation plaquettaire. Comme décrit précédemment, ces ω-3 inhibent la synthèse des thromboxanes A_2, et ces prostanoïdes sont impliqués dans l'agrégation plaquettaire.

Malgré les résultats positifs issus des études expérimentales et épidémiologiques concernant les huiles de poissons riches en AGPI ω-3 à LC dans le domaine cardiovasculaire, ces résultats restent controversés au niveau clinique. Entre 2005 et 2012, 18 essais cliniques ont été effectués concernant ces huiles de poisson et la prévention des accidents cardiovasculaires dans les populations dites à risque (personnes ayant déjà eu un antécédent,

ou présentant de forts facteurs de risque) (Grey and Bolland, 2014). Sur ces études, uniquement deux d'entre elles ont reporté un bénéfice d'une supplémentation (Studer et al., 2005; Yokoyama et al., 2007). Ainsi, les essais cliniques, dans la limite de leur conception, n'ont pas convaincu sur l'utilisation systématique d'une supplémentation en EPA/DHA. En revanche, très peu d'études se sont focalisées sur leur précurseur, l'ALA.

D. L'acide alpha-linolénique et l'AVC

L**'acide α-linolénique** (son nom vient du grec « *linon* » qui signifie le lin) est le précurseur des AGPI ω-3 à LC, tels que l'EPA et le DHA (figure 16). C'est le seul véritable AG ω-3 essentiel ; il doit donc obligatoirement être apporté par l'alimentation. Les aliments riches en ALA sont évidemment les graines et l'huile de lin, mais aussi l'huile de colza, l'huile de soja, les graines de citrouille, les graines de Périlla (sésame sauvage), le tofu, ou encore les noix. De par son très faible taux de bioconversion, chez l'Homme, en AGPI ω-3 à LC (0,2% en EPA et 0,05% en DHA) (Brenna et al., 2009), l'ALA n'a pas fait l'objet d'autant d'études que ses dérivés. Pourtant, une déficience en ALA entraîne, chez l'Homme, une altération de l'acuité visuelle, qui est accompagnée d'une diminution de la concentration en DHA dans la rétine et dans le cerveau. Malgré une faible bioconversion de l'ALA, ces résultats suggèrent qu'un apport insuffisant en ALA diminue l'incorporation du DHA dans les membranes neuronales (Vinton et al., 1990). Néanmoins, ce déficit fut associé à la réduction de la concentration en DHA, et non pas à la déficience en ALA propre. Au vu des bénéfices cardiovasculaires des AGPI ω-3 à LC, la communauté scientifique et médicale s'est interrogée : l'ALA possède-t-il également ses propres propriétés protectrices ? Ce n'est qu'à partir des années 2000, que des études ont rapporté des effets bénéfiques de cet ω-3 végétal.

1. Les effets bénéfiques de l'ALA au niveau cardiovasculaire

Les bénéfices cliniques n'ont pas été observés de manière cohérente dans toutes les études. La plupart des études observationnelles prospectives suggèrent que la consommation d'ALA est associée à une réduction de l'incidence de la maladie coronarienne. Le tableau 1 récapitule les études portant sur l'ALA et ses effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire. Des études épidémiologiques ont ainsi montré qu'un apport entre 1 et 3g/jour permettait de réduire le risque de coronaropathie (Mozaffarian, 2005), d'infarctus du myocarde (Campos et al., 2008) et le risque d'AVC (de Goede et al., 2011). En 2006, une revue systématique de 14 essais contrôlés randomisés, 25 études de cohortes prospectives et

17 études de cas-témoins, a reporté qu'une augmentation de la consommation d'EPA et de DHA, mais pas celle de l'ALA, réduit les taux de mortalité suite aux accidents cardio- et cérébrovasculaires (Wang et al., 2006). Cependant, les auteurs de cette revue ont admis la difficulté à évaluer avec précision l'apport en ALA à partir de simples questionnaires. Pour tenter d'éliminer ces imprécisions, des biomarqueurs d'acides gras ont été utilisés, permettant de mettre en évidence que l'ALA (mesuré dans les tissus adipeux) est inversement associé à la survenue des accidents cardiaques (Harris et al., 2007).

Etude	Dose d'ALA(g/jour)	Nombre d'individus	Effets observés
(Mozaffarian, 2005)	2-3	...	Diminution du risque de coronnopathie (prévention primaire et secondaire)
(Campos et al., 2008)	1,5	3000	Diminution du risque d'infarctus du myocarde
(de Goede et al., 2011)	1	20 000	Réduction de 30 à 50% le risque d'AVC
(de Lorgeril et al., 1994)	2	600	Diminution de 70% le risque de maladie cardiovasculaire
(Kromhout et al., 2010)	2	5000	Diminution de récidive d'accident cardiovasculaire

Tableau 1 : Récapitulatif des études épidémiologiques et cliniques sur l'effet bénéfique de l'ALA sur les maladies cardiovasculaires.

Au niveau clinique, très peu d'études ont été menées sur l'ALA. Néanmoins, il semblerait que l'ALA ait un effet cardio-protecteur. En effet, l'étude de Lyon (*Lyon Diet Heart Study*), un essai clinique randomisé, a évalué l'efficacité d'un régime de type méditerranéen riche en ALA en prévention secondaire. Plus concrètement, les patients du groupe expérimental devaient consommer chaque jour plus de pain, de légumes, de poissons et moins de viandes, des fruits et remplacer le beurre et les crèmes par de la margarine, à base d'huile de colza. Après 27 mois, le risque de mort cardiovasculaire fut réduit d'environ 70% chez le groupe expérimental (de Lorgeril et al., 1994). L'effet protecteur de ce régime méditerranéen est maintenu 4 ans après le premier infarctus du myocarde (de Lorgeril et al., 1999). L'ALA était le seul acide gras significativement associé à cette protection. En effet,

leur analyse n'indiquait aucune association entre l'EPA et le DHA avec l'incidence des maladies cardiovasculaires (de Lorgeril et al., 1999).

Plus récemment, un essai clinique à grande échelle, l'essai « Alpha Omega », portant sur près de 5 000 patients ayant déjà eu une attaque du myocarde (prévention secondaire), a été mené pour différencier les effets de l'ALA de ceux de l'EPA/DHA sur les maladies cardiovasculaires (Kromhout et al., 2010). Pour cela, les participants ont reçu une des quatre margarines de l'étude : une margarine supplémentée en EPA et DHA (400mg/jour), ou une margarine supplémentée en ALA (2g/jour), ou une margarine supplémentée en ALA, mais aussi en EPA et DHA, ou encore une margarine placébo. Après 40 mois, les deux groupes ayant eu une margarine supplémentée en ALA (avec ou sans EPA/DHA) avaient un taux de récidive inférieur de 9% comparé aux groupes ayant reçu seulement l'EPA et le DHA ou le placébo.

Sur la base de ces deux études, il semble que l'ALA possède des propriétés bénéfiques pour le système cardiovasculaire, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ces résultats. Néanmoins, compte tenu des preuves croissantes suggérant l'ALA comme un supplément nutritionnel bénéfique au niveau cardiovasculaire, des études ont été menées pour tenter d'élucider les mécanismes sous-jacents. Le mécanisme le plus étudié fut naturellement l'inflammation, puisque les ω-3 ont des propriétés anti-inflammatoires.

2. Les effets de l'ALA sur l'inflammation

Des études expérimentales ont montré que la supplémentation nutritionnelle en ALA permet de réduire l'inflammation, et plus particulièrement la différentiation, l'activation et la prolifération des lymphocytes T (leucocytes impliqués dans la réponse immunitaire secondaire), dans un modèle murin d'athérosclérose (un facteur de risque important d'AVC) (Winnik et al., 2011). D'autres études suggèrent un effet anti-inflammatoire de l'ALA similaire à celui de ses dérivés à longue chaîne. En effet, dans une étude sur une lignée cellulaire leucémique humaine, l'ALA et le DHA ont un puissant effet inhibiteur sur la réponse inflammatoire induite par le lipopolysaccharide (LPS, un composant essentiel de la face externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif) (Zhao et al., 2005).

Quelques études interventionnelles rapportent également un effet anti-inflammatoire de l'ALA chez l'Homme. Chez des patients souffrant de dyslipidémie, une diminution des protéines pro-inflammatoires est observée à la suite d'une supplémentation nutritionnelle en ALA (à partir d'huile de lin et de noix) (Zhao et al., 2004). Les auteurs de cette étude ont

observé que l'ALA réduit le risque de maladies cardiovasculaires, d'une part par son effet hypolipidémiant, mais également en inhibant l'inflammation vasculaire et l'activation endothéliale. L'étude, *in vitro,* des cellules mononucléaires sanguines des différents sujets soumis à différents régimes a permis d'évaluer les effets de la supplémentation nutritionnelle en ALA sur la production des cytokines pro-inflammatoires (Zhao et al., 2007). L'augmentation de l'apport en ALA inhibe la production d'IL-6, d'IL-1β et de TNF-α par les cellules mononucléaires sériques (Poudyal et al., 2011). L'ALA présenterait des propriétés anti-inflammatoires, indépendamment de sa conversion en EPA et/ou DHA, par la réduction de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, des COX/LOX, et des métabolites de l'AA (Poudyal et al., 2011). Néanmoins, il existe des études ne montrant aucun impact de la supplémentation nutritionnelle en ALA sur l'inflammation des patients présentant des facteurs de risque cardiovasculaires (Bloedon et al., 2008). Etant donné que l'ALA a été moins étudié que l'EPA et le DHA, les données existantes à l'heure actuelle ne sont pas encore concluantes en ce qui concerne le rôle de l'ALA dans l'inflammation.

Ainsi, l'idée qu'un apport en ALA soit bénéfique, chez l'Homme, dans les maladies cardiovasculaires, commence à émerger, mais les mécanismes restent encore inconnus. Mon laboratoire d'accueil s'est intéressé à l'ALA et à la compréhension des ses mécanismes protecteurs dans des modèles expérimentaux d'accident vasculaires cérébraux.

3. L'acide α-Linolénique : un potentiel nutraceutique contre l'AVC

La thématique de mon laboratoire d'accueil est le développement de stratégies thérapeutiques innovantes pour le traitement de la dépression et de l'AVC. Concernant l'AVC, ils se sont intéressés sur le potentiel des molécules naturelles pour éviter les différents effets secondaires des molécules chimiques (cf. Chapitre II.1). Ils se sont intéressés aux AGPIs ω-3, et plus particulièrement à l'ALA. L'ALA étant un nutriment, le laboratoire s'est demandé s'il pouvait être un nutraceutique. Le terme « nutraceutique » est un néologisme provenant des mots « nutrition » et « pharmaceutique ». Inventé en 1989 par le Dr. Stephen DeFelice, ce terme désignait tout aliment possédant des bénéfices sur la santé, y compris la prévention et/ou le traitement d'une pathologie (Kalra, 2003).

Une définition aussi large a entraîné un abus de langage, souvent à des fins de marketing par certaines industries agro-alimentaires. C'est pourquoi des définitions plus précises ont été apportées, notamment pour différencier les aliments fonctionnels, les compléments alimentaires et les nutraceutiques. Un **aliment fonctionnel** est un aliment

semblable en apparence à un aliment conventionnel. Il fait partie de l'alimentation normale et il a été démontré qu'il procure, au-delà des fonctions nutritionnelles de base, des bienfaits physiologiques précisés par la documentation scientifique et qu'il réduit le risque de maladies chroniques. Le brocoli, l'oignon, l'huile d'olive et les poissons gras, par exemple, sont des aliments fonctionnels. Ces aliments sont fonctionnels, car ils renferment plusieurs nutriments (composants élémentaires contenus dans les aliments) bénéfiques tels que les sulforafanes, les flavonoïdes ou les AGPIs ω-3, respectivement. Un **complément alimentaire** est un nutriment administré dans le seul but de couvrir une carence, alors qu'un **nutraceutique** est, lui aussi, un nutriment, donc obtenu à partir d'aliments, mais qui, lorsqu'il est administré sous forme médicinale possède un effet physiologique bénéfique ou assure une protection contre les maladies chroniques.

Le laboratoire a donc entrepris d'évaluer les effets de l'ALA dans des modèles expérimentaux d'AVC, tout en respectant les recommandations du STAIR.

a) L'ALA : un nouvel agent neuroprotecteur

Ils ont donc étudié l'effet de l'ALA sur l'excitotoxicité et la neuroprotection après un stress ischémique. Ces études ont été menées dans le laboratoire du Pr. Michel Lazdunski, qui avait découvert, à cette époque, un nouveau canal potassique, cible potentielle de certains neuroprotecteurs, le **canal TREK-1**.

Le canal TREK-1 est un canal K^+ à deux domaines « pore » (canaux K_{2P}) (Lesage and Lazdunski, 2000). Comme leur nom l'indique, les canaux K_{2P} ont la caractéristique unique de posséder deux domaines P (P pour pore), en tandem (P1 et P2), avec 4 segments transmembranaires (M1 à M4) et une large boucle extracellulaire M1/P1 (figure 17). Les domaines P participent à la formation du filtre de sélectivité pour l'ion K^+. Certains canaux K_{2P} (TWIK-1, TREK ou, TRAAK) sont essentiellement exprimés dans le cerveau. Ces canaux produisent des courants instantanés, indépendants du potentiel, qui sont qualifiés de courants K^+ de fond, impliqués dans le contrôle du potentiel de repos membranaire.

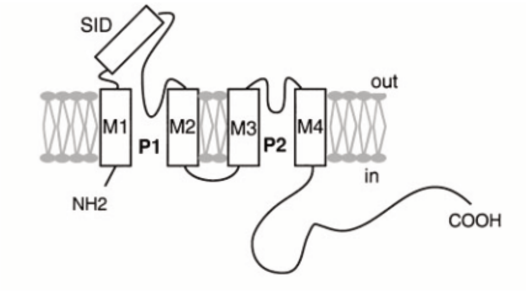


Figure 17 : Représentation schématique de la sous-unité d'un canal K_{2P}.

Une des découvertes intéressantes fut l'activation de ce canal par le riluzole, un neuroprotecteur utilisé en clinique chez des patients atteints de sclérose latérale amyotrophique (Duprat et al., 2000), et par les AGPIs, tel que l'ALA, le DHA, l'EPA et l'AA (Fink et al., 1998b; Lesage et al., 2000). Les acides gras saturés n'ont, quant à eux, aucun effet. Ces données suggèrent que les effets neuroprotecteurs du riluzole (Ettaiche et al., 1999) pourraient être dus à l'activation de ce canal, qui induirait une hyperpolarisation des neurones et donc une réduction de l'excitotoxicité. Le laboratoire s'est donc demandé si l'ALA pouvait agir sur l'excitotoxicité en activant ce canal TREK-1.

Dans un modèle *in vitro* d'excitotoxicité (-Mg^{2+}/+glycine), le traitement d'ALA à 10 μM diminue de 80% la mort des neurones glutamatergiques de cervelet (Lauritzen et al., 2000). L'ALA serait donc capable de contrecarrer l'excitotoxicité entrainant une neuroprotection. L'étape suivante fut d'étudier l'effet de l'ALA sur la mort neuronale chez l'animal. Dans un modèle *in vivo* d'ischémie globale transitoire (10 à 30min ; box 2) mimant un infarctus chez le rat, l'injection *i.v* d'ALA, à des concentrations de 100 à 500 nmol/kg, 30 minutes avant ou après l'ischémie, protège les neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe (Lauritzen et al., 2000). L'hippocampe est la structure la plus vulnérable à l'ischémie globale, et une ischémie globale transitoire entraîne la mort d'environ 80% des neurones pyramidaux (figure 18) (Lauritzen et al., 2000).

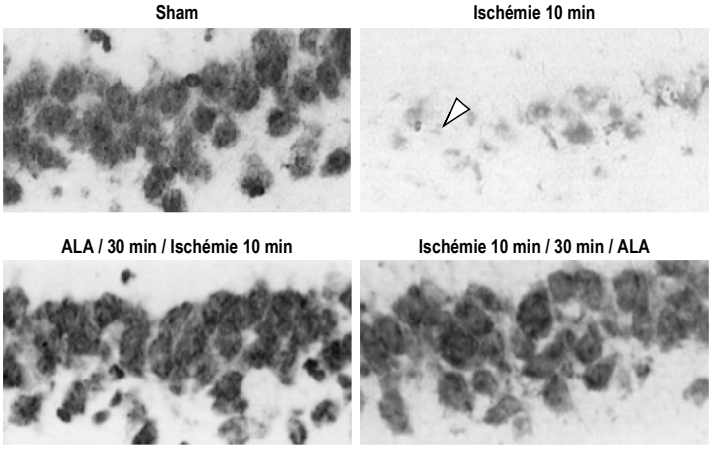


Figure 18 : Neuroprotection de l'ALA dans un modèle d'ischémie globale transitoire, d'après (Lauritzen et al., 2000).

Les effets neuroprotecteurs de l'ALA (Blondeau et al., 2002), pourraient être dus à l'activation du canal TREK-1 qui induirait une hyperpolarisation des neurones et donc une réduction de l'excitotoxicité. Cette hypothèse fut validée avec la génération de souris déficientes en TREK-1. En effet, l'inhibition génétique de TREK-1 chez les souris est délétère dans l'ischémie globale (Heurteaux et al., 2004). L'ischémie globale entraîne une augmentation de 40% du taux de mortalité chez les souris TREK1$^{-/-}$ par rapport aux souris sauvages. Plus intéressant encore, les effets protecteurs de l'ALA ne sont pas retrouvés chez les souris TREK1$^{-/-}$. L'invalidation d'autres canaux K_{2P}, tel que le canal TRAAK, n'a aucun impact sur la sensibilité à la lésion ischémique cérébrale. Le canal TREK-1 confère donc une résistance à la mort due à l'hyperexcitabilité induite par une ischémie. Ce travail (Heurteaux et al., 2004) démontre que le canal TREK-1 est essentiel dans le contrôle de l'hyperexcitabilité et un facteur clé dans la neuroprotection induite par l'ALA.

Dans le cadre d'une approche préventive, ils ont montré que l'ALA induit une tolérance ischémique (Blondeau et al., 2002). En effet, une injection *i.v* de 500 nmol/kg d'ALA, trois jours avant une ischémie globale sévère prévient la mort neuronale induite normalement par cet épisode ischémique. Le laboratoire a comparé l'effet de l'ALA à d'autres AGPIs, tels que l'AA et le DHA : l'ALA est celui qui procure la neuroprotection la plus efficace et la plus reproductible. Cette tolérance ischémique obtenue par l'ALA est associée à l'activation du facteur de transcription NFKB (Blondeau et al., 2001), à l'induction de protéines anti-apoptotiques, telles que la protéine de choc thermique HSP 70 (*heat shock proteins)* et à l'inhibition de l'expression de protéines pro-apoptotiques, telles que

Bax (*Bcl-2–associated X protein*) (Blondeau et al., 2002). L'ALA possède donc plusieurs cibles pouvant entrainer une neuroprotection.

Mon équipe d'accueil a donc découvert, en **l'acide α-linolénique, un nouvel agent neuroprotecteur dans l'AVC**. L'une des recommandations du STAIR est que l'approche employée dans la lutte contre l'AVC doit être intégrative et doit pouvoir agir sur plusieurs acteurs de l'unité neuro-vasculaire. C'est pourquoi ils ont évalué l'effet de l'ALA sur le compartiment vasculaire.

b) L'ALA et le compartiment vasculaire

Après un AVC, la fonction des artères cérébrales est essentielle pour maintenir la perfusion cérébrale et préserver l'intégrité neuronale. Or, l'AVC affecte les fonctions vasculaires en modifiant le tonus des artères lésées. La perte de la capacité de vasodilatation après un AVC compromet la perfusion du tissu cérébral. Dans un modèle de vaso-réactivité *ex vivo*, l'application de l'ALA sur l'artère basilaire augmente son diamètre, ce qui signifie que l'ALA favorise sa vasodilatation (Blondeau et al., 2007). Cet effet est spécifique aux artères impliquées dans la résistance vasculaire, puisque l'ALA n'a aucun effet sur la vaso-réactivité de l'artère carotide, expliquant ainsi l'absence d'effet systémique sur la pression artérielle (Blondeau et al., 2007). Des mesures *in vivo* du débit sanguin cérébral, par un laser Doppler, ont permis de mettre en évidence que l'injection en *i.v* de la dose neuroprotectrice d'ALA (500 nmol/kg) permet d'augmenter le DSC chez les rongeurs. Cet effet Je de l'ALA est perdu chez les souris TREK-1$^{-/-}$ (Blondeau et al., 2007), impliquant un rôle crucial de TREK-1 dans les effets bénéfiques de l'ALA contre l'AVC.

Cette étude apporte la preuve que l'ALA est non seulement bénéfique pour les neurones, mais est également d'un grand intérêt pour le compartiment vasculaire. L'ALA a donc des **effets pléiotropiques**, par rapport aux agents neuroprotecteurs classiques, ciblant uniquement les neurones et ayant tous échoué dans les études cliniques. L'ALA représente ainsi une stratégie thérapeutique prometteuse face à l'AVC.

Le laboratoire s'est ensuite intéressé à l'éventuel effet de l'ALA sur les mécanismes de protection endogène du cerveau contre l'AVC, et plus particulièrement sur la plasticité cérébrale.

c) L'ALA et la plasticité cérébrale

Pour rappel, la plasticité cérébrale est définie comme l'ensemble des mécanismes qui permettent au cerveau d'adapter son fonctionnement à une situation nouvelle. La plasticité

cérébrale a lieu après un AVC et aide à la récupération neurologique. Mon équipe d'accueil a montré que le **traitement subchronique en ALA** (3 injections *i.v* de 500 nmol/kg tous les 3 jours) **favorise la plasticité cérébrale chez la souris** (Blondeau et al., 2009). En effet, ce traitement subchronique permet d'augmenter la neurogenèse dans le gyrus denté. Le traitement augmente significativement la prolifération de neurones immatures qui survivent et deviennent à long-terme des neurones matures. Cette neurogenèse est accompagnée d'une augmentation de la synaptogenèse dans le gyrus denté, mais également dans le cortex, où l'expression des protéines impliquées dans la fonction synaptique est aussi augmentée. Le traitement subchronique en ALA induit l'expression protéique de VAMP-2 (*Vesicle-Associated Membrane Protein 2*), SNAP-25 (*Synaptosomal-Associated Protein 25*) et de la synaptophysine-1, trois protéines impliquées dans le trafic et l'arrimage vésiculaire pré-synaptique. L'expression des transporteurs de glutamate (VGLUT1 etVGLUT2) est également augmentée avec le traitement subchronique (Blondeau et al., 2009). De plus, ces effets sont corrélés à une augmentation de l'expression du facteur neurotrophique BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) *in vivo* dans le cerveau des souris traitées, et *in vitro* dans les cultures de neurones hippocampiques (Blondeau et al., 2009). L'ALA permet donc de favoriser un mécanisme potentiellement bénéfique dans le cadre de l'AVC, notamment pour la récupération fonctionnelle post-AVC.

L'ALA possède donc de nombreuses propriétés intéressantes pour lutter contre l'AVC ischémique. Chez l'Homme, l'occlusion de l'artère sylvienne représente 80% des AVC ischémiques. Pour reproduire cet AVC, l'artère cérébrale moyenne, correspondant à l'artère sylvienne, est obstruée de manière transitoire ou permanente (MCAo ; box2) (Lo, 2008; Mhairi Macrae, 1992). Chez l'Homme, l'occlusion des artères cérébrales est rarement permanente : dans la majorité des cas il apparaît une reperfusion spontanée (plus ou moins rapide), et dans certains cas la reperfusion est permise par la thrombolyse (Lo, 2008; Mhairi Macrae, 1992). Le laboratoire a donc étudié le potentiel bénéfice de l'ALA comme neuroprotecteur dans un modèle d'ischémie cérébrale focale, la MCAo.

d) L'ALA, un traitement contre l'ischémie cérébrale focale

D'après les recommandations du STAIR, pour qu'une molécule soit considérée comme efficace, les deux premiers paramètres à évaluer en préclinique sont la taille de la lésion cérébrale et la mortalité.

L'administration de l'ALA sous forme médicinale (injection *i.v* à 500 nmol/kg) permet de réduire le volume de la lésion cérébrale. Une réduction de l'infarctus cérébral est obtenue

lorsque cette injection est effectuée jusqu'à 6 heures après l'occlusion transitoire (60 min) (Heurteaux et al., 2006). L'ALA possèderait donc une fenêtre thérapeutique transposable en clinique, puisqu'elle est plus importante que celle obtenue avec l'administration du t-PA.

Concernant la mortalité induite par la MCAo, une seule injection d'ALA en post-traitement n'apporte aucune amélioration du taux de survie. La modification de la posologie, à savoir des injections répétées sur 3 semaines, permet d'améliorer par un facteur 3 le taux de survie des animaux, un mois après la MCAo (Heurteaux et al., 2006). Ce résultat suggère que le traitement subchronique en ALA améliore le taux de survie à long-terme en agissant sur d'autres mécanismes que l'excitotoxicité, un phénomène transitoire qui a lieu pendant les premières heures post-ischémiques. Ainsi, les effets bénéfiques de l'ALA contre l'ischémie cérébrale sont d'une part dus à une action directe sur l'unité neuro-vasculaire, mais aussi à la stimulation de mécanismes endogènes impliqués dans la régénération et la récupération cérébrale (plasticité cérébrale).

Le laboratoire a donc identifié un nutriment qui possède des bénéfices notables sur la santé du rongeur, et ce nutriment peut être administré sous forme médicinale. L'ALA serait donc un ***nutraceutique*** (Blondeau et al., 2009; Blondeau et al., 2007; Heurteaux et al., 2006).

Le laboratoire s'est ensuite intéressé au potentiel d'une supplémentation nutritionnelle en ALA sur les dommages liés à l'AVC ischémique.

e) La supplémentation nutritionnelle en ALA et l'AVC

La **supplémentation nutritionnelle** est un apport de nourriture sélective pour lutter généralement contre des carences. Dans notre cas, la supplémentation nutritionnelle en ALA a été évaluée sans présence de carence. L'apport de nourriture peut être obtenu par différents types de supplémentation : par voie entérale ou parentérale. **La voie entérale** se fait par l'intermédiaire du tube digestif, il existe 3 voies entérales : la voie buccale (le médicament est administré dans la bouche), la voie orale (le médicament est avalé par la bouche) et la voie rectale. La **voie parentérale** consiste en l'administration du médicament par une injection.

Mon équipe d'accueil a évalué l'effet d'une supplémentation nutritionnelle en ALA, à titre préventif, dans un modèle expérimental d'ischémie cérébrale. Au vu des résultats obtenus avec les injections *i.v* d'ALA, ils ont logiquement étudié la supplémentation nutritionnelle parentérale. Les injection *i.v* d'ALA, en prétraitement (10, 7 et 3 jours avant la MCAo), permettent de réduire la taille de la lésion cérébrale 24h après l'ischémie (Blondeau et al., 2009). Il est évident qu'une telle approche préventive ne peut être appliquée à l'Homme. Le

laboratoire s'est alors orienté vers une approche nutritionnelle par voie orale, qui serait plus utile pour une application chez l'Homme.

Un régime alimentaire expérimental a donc été conçu pour obtenir une supplémentation orale en ALA. Les sources naturelles d'ALA sont exclusivement végétales. Les huiles dites linoléniques apportent une quantité importante d'ALA, c'est le cas des huiles de lin (54% d'ALA), noix (12% d'ALA), colza (8-10% d'ALA) et soja (4-7% d'ALA). Le régime expérimental a été produit à partir d'**huile de colza** pour plusieurs raisons. Premièrement, c'est l'huile apportant le moins de LA avec l'huile de lin (18-22% au lieu de 50 à 65% dans les autres huiles), ce qui permet de conserver un ratio LA/ALA (ω-6/ω-3) nettement inférieur à 5. D'autre part, l'huile de colza offre une plus grande biodisponibilité en ALA et une meilleure palabilité comparée aux autres huiles linoléniques. C'est d'ailleurs pour cela que l'huile de colza est communément utilisée comme un aliment fonctionnel bénéfique pour le système cardiovasculaire (de Lorgeril and Salen, 2004; Gebauer et al., 2006). Le régime expérimental est composé de 10% de lipides provenant exclusivement de l'huile de colza, ce qui permet d'obtenir 0,75g d'ALA pour 100g de croquettes (0,75% d'ALA) (Nguemeni et al., 2013). Ce régime enrichi en ALA apporte 3 fois plus d'ALA que le régime standard, qui est composé de 5% de lipides provenant essentiellement du soja et apportant 0,25% d'ALA. Ce régime, en apportant sélectivement de l'ALA, permet la supplémentation nutritionnelle en cet AGPI ω-3 chez la souris. Il est important de noter que le régime standard contient tous les nutriments (dont l'EPA et le DHA) à des doses recommandées pour les rongeurs (Bourre et al., 1993; Pudelkewicz et al., 1968). En revanche, pour se focaliser uniquement sur l'effet de la supplémentation en ALA, le régime expérimental ne contient pas d'EPA ni de DHA.

L'étude a consisté à évaluer l'effet de 6 semaines d'un régime apportant 3 fois plus d'ALA qu'un régime standard sur les conséquences d'une ischémie cérébrale focale transitoire (MCAo de 60 min) (Nguemeni et al., 2010). Le régime enrichi en ALA a permis la réduction du taux de mortalité d'un facteur 3, ainsi que celle de la taille de la lésion cérébrale 24 h après la MCAo, similaire à celle obtenue avec le traitement subchronique (Nguemeni et al., 2010). Une augmentation du taux de reperfusion spontanée a également été observée chez les animaux nourris avec le régime contenant 0,75% d'ALA (61,7 % de reperfusion au lieu de 41,4%), confirmant encore une fois l'effet de l'ALA sur le compartiment vasculaire. Cette étude a permis de mettre en évidence un autre effet pléiotropique de la supplémentation en

ALA. En effet, le régime enrichi en ALA réduit la peroxydation lipidique, un marqueur indirect du stress oxydatif suivant l'ischémie cérébrale (Nguemeni et al., 2010). Comme décrit précédemment, l'AVC ischémique génère des ROS, ce qui conduit à la peroxydation lipidique, un phénomène néfaste dans la physiopathologie de l'AVC. Le régime enrichi en ALA permet de réduire la production de malondialdehyde (MAD), un indicateur de la peroxydation lipidique, uniquement après l'ischémie cérébrale focale (Nguemeni et al., 2010). La supplémentation en ALA permet donc également de réduire le stress oxydatif suite à un AVC.

L'ALA peut représenter, de par ses effets pléiotropiques, une nouvelle stratégie thérapeutique prometteuse dans la lutte contre l'AVC. En effet, l'ALA remplit bon nombre des recommandations du STAIR. Il reste à étudier néanmoins un paramètre, crucial pour une translation vers la clinique, à savoir l'effet de la supplémentation entérale et parentérale en ALA sur la récupération fonctionnelle (motrice et cognitive) post-AVC. Par ailleurs, l'ALA agit sur les neurones et les vaisseaux, pourrait-il aussi agir sur le dernier grand composant de l'UNV, les cellules gliales ? Sachant que l'ALA semble avoir des effets anti-inflammatoires, la supplémentation en ALA peut-elle agir sur la neuroinflammation post-ischémique ?

Ces questions ont conduit à mon travail de thèse.

Objectifs

L'objectif de mon doctorat est d'approfondir les connaissances sur le potentiel de l'ALA comme traitement pour l'une des priorités les plus urgentes de la médecine, l'AVC. Préalablement, le laboratoire a validé la preuve du concept de l'intérêt de l'ALA pour réduire l'infarctus cérébral post-AVC et a révélé certains de ses effets pléiotropiques protecteurs résumés dans deux revues auxquelles j'ai participé :

- ✓ Nguemeni, C., Gouix, E., **Bourourou, M.**, Heurteaux, C., Blondeau, N. Alpha-linolenic acid: A promising nutraceutical for the prevention of stroke. (2013) *PharmaNutrition*. (Annexe 1)
- ✓ Blondeau, N., Lipsky, R. H., **Bourourou, M.**, Duncan, M. W., Gorelick, P. B., Marini, A. M. Alpha-linolenic acid: an omega-3 fatty acid with neuroprotective properties-ready for use in the stroke clinic? (2015) *BioMed Res Int*. (Annexe 2)

La finalité de tout traitement de l'AVC est d'éviter l'altération de la qualité de vie des patients. Pour évaluer l'efficacité de potentiels agents thérapeutiques en préclinique, il est essentiel de caractériser leurs effets sur la récupération fonctionnelle à long terme. C'est pourquoi, **le premier objectif de mon doctorat a été d'étudier l'effet de la supplémentation nutritionnelle en ALA sur la récupération fonctionnelle dans un modèle d'AVC murin**. Pour cela, j'ai donc comparé l'effet de deux approches de supplémentation nutritionnelle en ALA, par voie orale et par voie intraveineuse sur deux paramètres de la récupération fonctionnelles, à savoir les déficits moteurs et les déficits cognitifs. Ce travail a donné lieu à un article original :

- ✓ **Bourourou, M**., Heurteaux, C., Blondeau, N. Alpha-linolenic acid given as enteral or parenteral nutritional intervention against sensorimotor and cognitive deficits in a mouse model of ischemic stroke. (2016) *Neuropharmacology* (Annexe 3).

L'étude des mécanismes impliqués dans les bénéfices apportés par l'ALA après un AVC m'a ensuite conduit à caractériser :

- ✓ **Le rôle neurotoxique de la chimiokine CCL2 post-AVC et à identifier la réduction de son expression post-ischémique, comme un facteur clef de la protection cérébrale induite par un traitement à l'ALA**. Un article est en cours de rédaction.

- ✓ **L'implication de la voie de signalisation de la chimiokine CCL2 (ou MCP-1) et de son récepteur CCR2, dans la perte de poids induite par une inflammation du système nerveux central**. Ce travail, fruit d'une collaboration entre le Dr. Nicolas Blondeau et le Dr. Carole Rovère (équipe du Dr. Jean-Louis Nahon : Génomique & évolution en neuro-endocrinologie (GENE) à l'IPMC) a été accepté dans *Embo Reports* : Le Thuc, O., Cansell, C., **Bourourou, M.**, Denis, R.G.P., Stobbe, K., Devaux, N., Guyon, A., Cazareth, J., Heurteaux, C., Rostène, W., Luquet, S., Blondeau*, N., Nahon*, J-L., Rovère*, C. Central CCL2 signaling onto MCH neurons mediates metabolic and behavioral adaptation to inflammation. (2016) *Embo Reports*. (Annexe 4).

Résultats et Discussion

I. Un support nutritionnel en ALA, par voie entérale ou parentérale, permet de réduire les déficits moteurs et cognitifs, dans un modèle murin d'ischémie cérébrale (Annexe 3)

A. Effet de la supplémentation nutritionnelle orale en ALA sur la récupération fonctionnelle post-ischémique

Mon laboratoire d'accueil avait démontré qu'un soutien nutritionnel préventif apporté par un régime enrichi en ALA permettait de réduire les dommages dans un modèle d'ischémie focale murin (Nguemeni et al., 2010), renforçant l'idée de l'intérêt d'une supplémentation orale en ALA contre l'AVC. La première partie de mon étude a donc été consacrée à apporter la preuve du concept que ce type de supplémentation orale en ALA pourrait être bénéfique pour la récupération fonctionnelle dans un modèle expérimental d'AVC.

Pour cela, la supplémentation nutritionnelle orale en ALA a donc été réalisée avec le régime enrichi (0,75% d'ALA) à partir d'huile de colza, contenant près de 3 fois plus d'ALA que le régime standard (Std. ; 0,25% d'ALA) caractérisé précédemment par l'équipe (Nguemeni et al., 2010). Dans ses précédentes études, le laboratoire avait systématiquement utilisé le modèle de MCAo de 60 min, connu pour induire des dommages cérébraux sévères (Blondeau et al., 2009; Heurteaux et al., 2006; Nguemeni et al., 2010). Aussi, la lésion et la mortalité induites par ce modèle étaient trop importantes pour étudier la récupération fonctionnelle à long terme. Le temps d'occlusion a dû être réduit de moitié, conformément au modèle de référence pour réaliser des études comportementales post-AVC chez la souris (Balkaya et al., 2013b).

Dans un premier temps, j'ai étudié l'effet de la supplémentation orale en ALA sur le taux de mortalité et le volume lésionnel, induits par la MCAo de 30 min. Dans le modèle de 30 min d'occlusion, la mortalité au 7ème jour post-AVC est de 20% (figure 19A), alors que l'occlusion de 60 min entraine 80% de mortalité (Nguemeni et al., 2010). Ce faible taux de mortalité, induit par la MCAo de 30 min, permet l'étude de la récupération fonctionnelle à long terme. Dans le modèle d'ischémie focale de 30 min, la lésion est principalement striatale (figure 19B), alors que l'occlusion de 60 min s'étend aussi au cortex (Balkaya et al., 2013b). La protection de l'ALA s'opérant principalement sur le cortex (Nguemeni et al., 2010), il n'est donc pas surprenant que le volume lésionnel, après une MCAo de 30 min ne soit pas

influencé par le régime enrichi en ALA (figure 19B). Ce point est d'importance car il exclut tous biais, liés à une réduction de la taille de la lésion, dans l'interprétation d'un éventuel bénéfice de la supplémentation nutritionnelle en ALA sur la récupération fonctionnelle post-AVC.

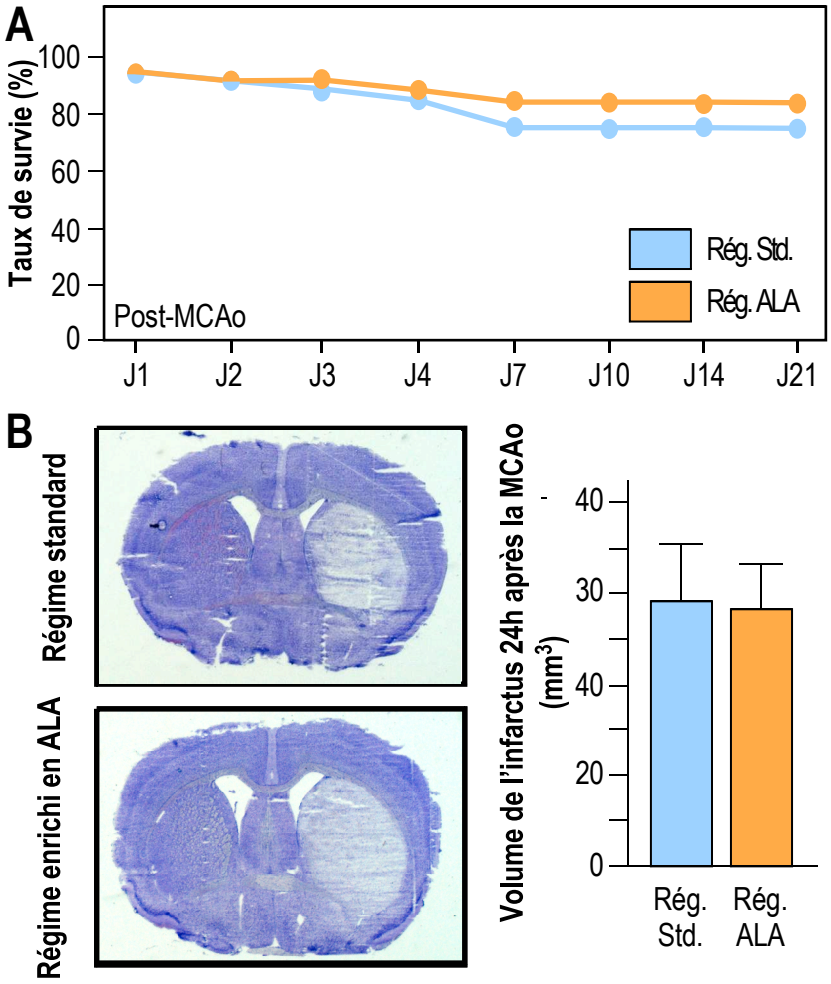


Figure 19 : Effet de la supplémentation orale en ALA sur la survie et l'infarctus cérébral après une MCAo de 30 min.
(A) Représentation graphique du taux de survie à long-terme des animaux. (B) Mesure de la taille de la lésion cérébrale, 24h après une MCAo de 30 min, par une coloration au crésyl violet. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n=35 par groupe).

Pour évaluer un éventuel bénéfice de la supplémentation nutritionnelle en ALA (par le régime enrichi) sur la **récupération motrice** des animaux, j'ai utilisé deux tests moteurs.

Le premier est le *Rotarod* (figure 20A). C'est un test qui permet d'évaluer la fonction motrice et la coordination des rongeurs. Il consiste à placer les animaux sur un axe en rotation et à mesurer le temps passé sur cet axe, dont l'accélération est définie. Le temps passé sur l'axe en rotation est corrélé à une meilleure performance motrice. La supplémentation en

ALA n'a aucun impact sur la fonction motrice (figure 20B, pré-op) en absence d'ischémie. Comme décrit dans la littérature, l'ischémie de 30 min diminue drastiquement les performances motrices des animaux qui présentent, ensuite, une grande capacité de récupération spontanée (Balkaya et al., 2013a; Freret et al., 2011). Au-delà du 7ème jour post-AVC, les déficits moteurs deviennent difficilement décelables avec ce modèle. Pourtant, la figure 20B montre que les souris nourries avec le régime enrichi en ALA présentent des performances 30% supérieures à celles des souris nourries avec le régime standard pendant la première semaine post-ischémique.

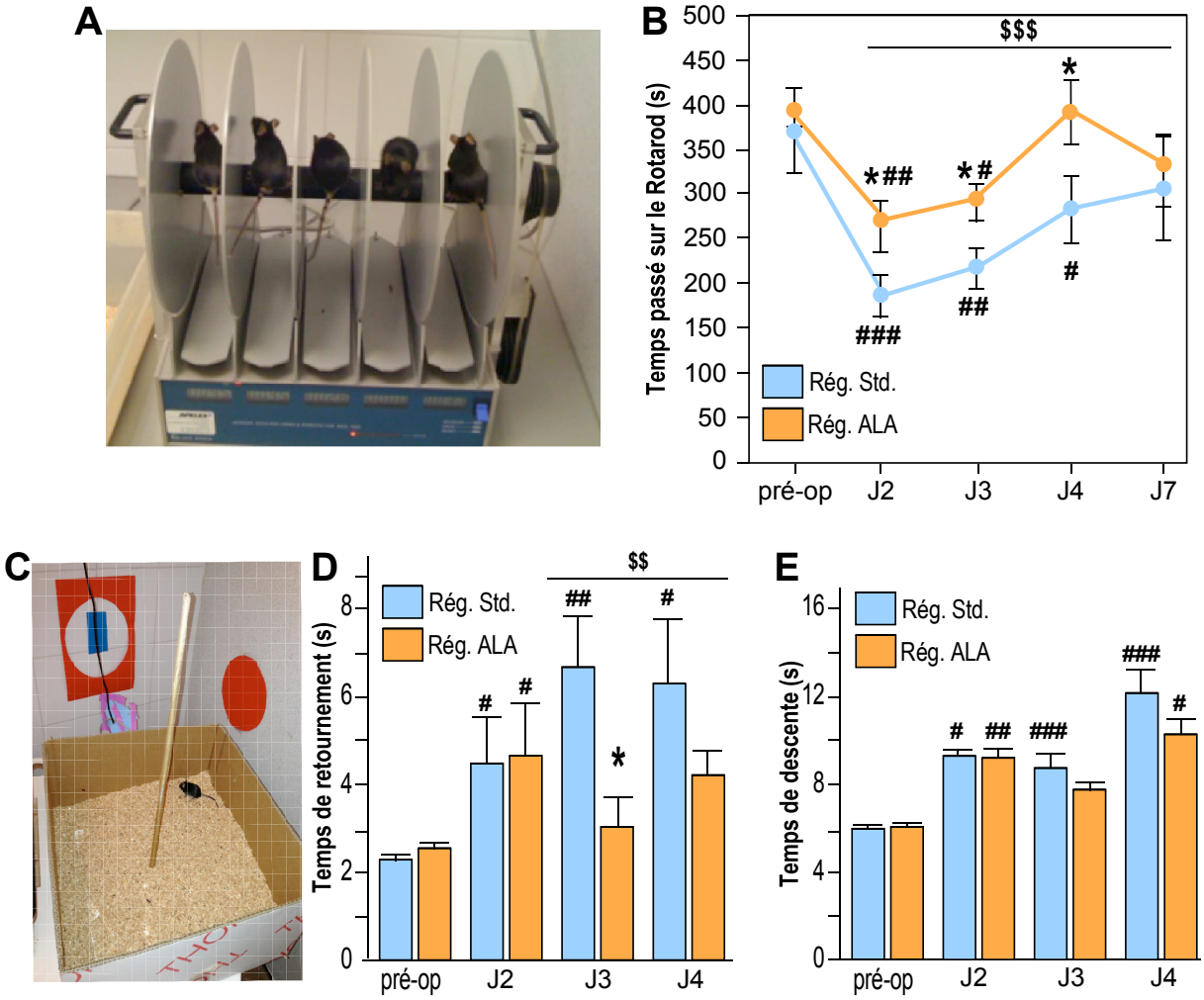


Figure 20 : Effet de la supplémentation orale en ALA sur les déficits moteurs post-MCAo, évalués par les tests du Rotarod et du mât.
(A) Photographie représentant les animaux sur le test du Rotarod. (B) Graphique représentant le temps passé sur le Rotarod durant la 1ère semaine post-ischémique. (C) Photographie représentant une souris lors du test du mât. (D) Histogramme représentant le temps mis par les animaux à se retourner complètement (E) Histogramme représentant le temps mis par les souris à descendre le long du mât. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n=25 par groupe). *p<0,05 par rapport au régime contrôle; #p<0,05; ## p<0,01; ### p<0,001 par rapport au performance pré-ischémique, et ($) indique un effet groupe entre les régimes ($$$p$<0,01; $$$$p$<0,001).

Des résultats similaires ont été obtenus dans le *test du mât* (figure 20C). Ce test permet d'évaluer la force des membres postérieurs, l'équilibre des animaux et la capacité à grimper.

Il consiste à placer le rongeur au sommet du mât, la tête vers le haut, et à mesurer le temps que met l'animal à se retourner complètement et le temps qu'il met à descendre le long du mât. Plus ces temps sont élevés, plus les déficits moteurs sont importants.

Comme précédemment, la supplémentation en ALA n'a aucun impact sur la fonction motrice pré-AVC. L'occlusion de 30 min altère la capacité des animaux à se retourner et à descendre le long du mât (figure 20D et 20E). Entre le 3ème et le 4ème jour après la MCAo, le temps de « retournement » est plus rapide chez les animaux nourris au régime enrichi en ALA comparé aux animaux nourris avec le régime standard, et plus particulièrement le 3ème jour post-MCAo (figure 20D). De plus le temps de « descente » qui est significativement plus long après 30 min de MCAo (figure 20E), que les animaux soient supplémentés ou non, semble s'améliorer aux 3ème et 4ème jours post-MCAo, chez les animaux supplémentés en ALA. Si cela est probablement corrélé à la réduction significative du temps de retournement, nous avons néanmoins observé que les animaux contrôles ont tendance à chuter ou glisser le long du mât. Cela pourrait aussi expliquer l'absence de différence significative sur la mesure quantitative du temps de descente, alors que l'aspect qualitatif de la descente était quant à lui clairement différent entre les deux groupes.

Nous avons ensuite étudié si les effets bénéfiques de la supplémentation orale en ALA, sur la récupération motrice s'étendaient à la **récupération cognitive**, après une MCAo de 30 min.

La cognition est un terme général qui comprend des processus tels que l'association, le langage, l'attention, la conceptualisation, la résolution de problèmes, l'apprentissage ou encore la mémoire. Selon Eric Kandel, « l'apprentissage est le processus par lequel nous acquérons la connaissance du monde, et la mémoire est le processus par lequel cette connaissance est codée, stockée et retranscrite ultérieurement ». La mémoire peut être divisée en tant que mémoire à court-terme (mémoire de travail) et mémoire à long-terme. La mémoire à court-terme a une capacité limitée et ne dure au maximum que quelques minutes. En revanche, la mémoire à long-terme peut stocker de grandes quantités d'informations pour une durée potentiellement illimitée. Cette mémoire à long-terme comprend la mémoire déclarative (ou explicite) et non-déclarative (ou implicite). La mémoire déclarative inclut les connaissances factuelles, à savoir les lieux, les choses, les personnes et la signification de ces faits. La principale structure cérébrale impliquée dans la mémoire déclarative est **l'hippocampe** (Squire and Zola, 1996). La formation d'une nouvelle mémoire déclarative est un processus séquentiel qui comprend 3 étapes et qui ont lieu dans l'hippocampe :

l'acquisition d'une nouvelle connaissance (encodage), la rétention de l'information (stockage) et le fait de la restituer en temps voulu (récupération). La consolidation de ce souvenir s'effectue dans le néocortex.

Chez le rongeur, l'évaluation de la cognition se restreint en grande majorité à **l'apprentissage** et à la **mémoire**, et plus particulièrement à la mémoire spatiale, une forme de mémoire déclarative. Pour évaluer l'effet de la supplémentation orale en ALA sur la récupération cognitive des animaux après une MCAo de 30 min, j'ai utilisé le test le plus couramment utilisé qui est celui de la *piscine de Morris*.

Ce test comprend deux phases : une phase d'apprentissage qui dure 4 jours et une phase de test au 5ème jour. La piscine est divisée en quatre cadrans égaux et une plate-forme y est cachée. L'apprentissage est évalué en mesurant le temps que l'animal met à trouver la plateforme grâce aux indices visuels autour de la piscine.

Il est décrit que deux semaines après une occlusion ischémique transitoire de 30 min, les déficits moteurs ischémiques n'ont plus d'influence sur les performances de nage dans le test de la piscine de Morris (Freret et al., 2011). C'est le cas dans nos 2 groupes d'animaux (figure 21A et 21B). Pour autant, le temps mis à retrouver la plateforme par les souris nourries au régime enrichi en ALA était significativement inférieur à celui des souris nourries au régime standard (figure 21C ; Anova 2 facteurs : effet groupe : F=10,78; $$*p*=0,0014). Cela suggère que l'apprentissage des animaux est amélioré par la supplémentation en ALA, 2 semaines après une ischémie cérébrale. Afin d'évaluer la mémoire spatiale des animaux, 18 jours après la MCAo, ces derniers ont été placés dans la piscine, où la plateforme a été retirée au préalable, et le temps passé dans chaque cadran fut mesuré. La figure 3 montre que le temps passé dans le cadran, où se trouvait normalement la plateforme (figure 21D) et le nombre de passages sur l'emplacement exact de la plateforme (figure 21E) étaient significativement augmentés chez les animaux supplémentés en ALA. Il existe donc un effet bénéfique sur la capacité de mémorisation post-MCAo dû au régime enrichi en ALA. Cet effet bénéfique a été confirmé lors de l'analyse des profils de nage (figure 21F) qui révèlaient une meilleure stratégie de recherche de la plateforme des souris nourries au régime enrichi en ALA. Enfin, le temps pour monter sur la plateforme visible, lors du « Cue Test », était similaire dans les deux groupes d'animaux, confirmant qu'il n'existe pas de différence au niveau visio-moteur entre les deux groupes d'animaux (figure 21G).

La supplémentation nutritionnelle en ALA, par un régime enrichi, permet d'améliorer la récupération motrice et cognitive spontanée après une ischémie cérébrale de 30 min chez la souris. Ces résultats apportent la preuve du concept qu'une supplémentation nutritionnelle orale en ALA présente un intérêt pour améliorer la récupération fonctionnelle post-AVC.

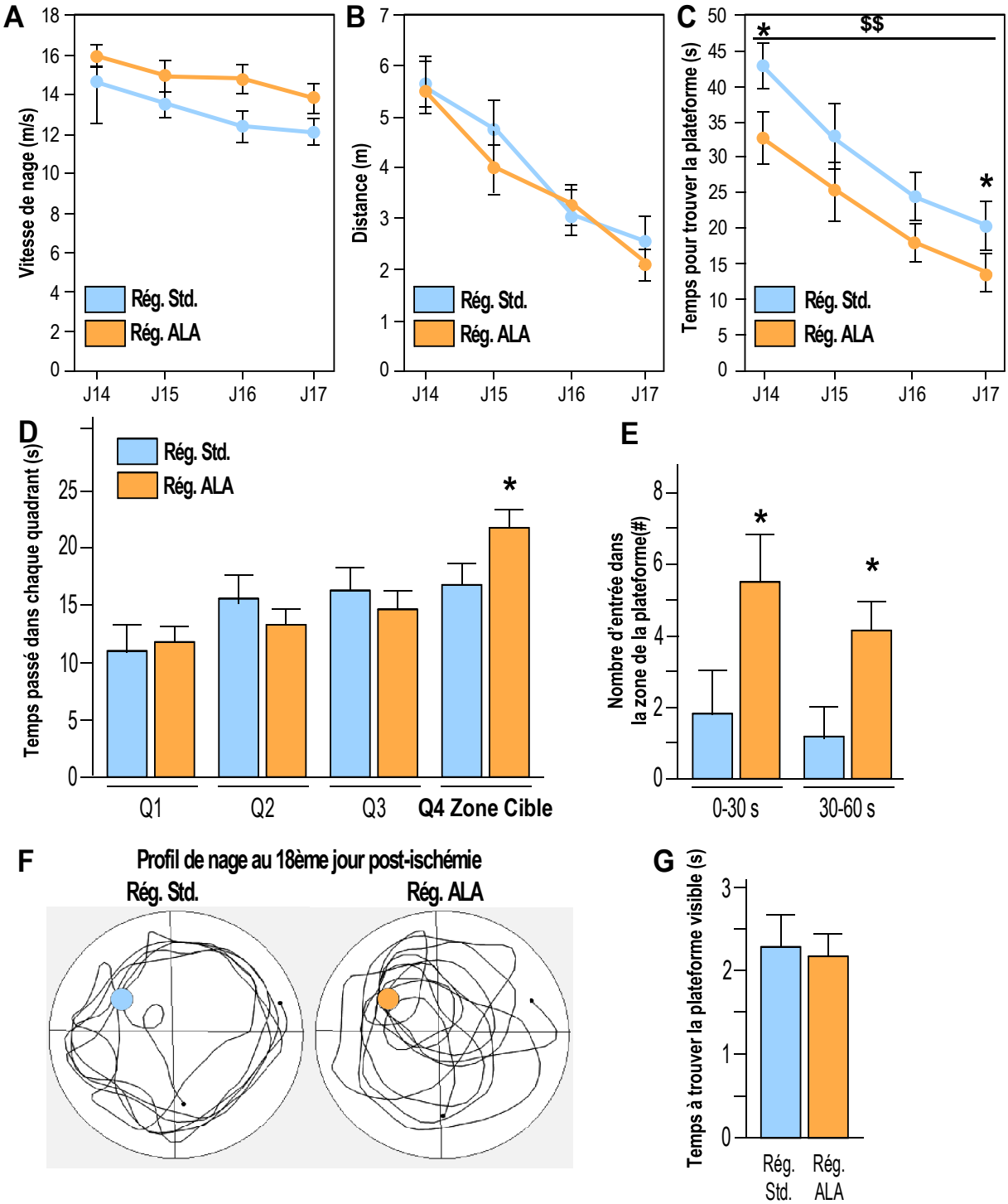


Figure 21 : Effet de la supplémentation orale en ALA sur la récupération cognitive post-ischémie, évaluée par le test de la piscine de Morris.

Entre le 14ème et le 17ème jour après la MCAo, la vitesse de nage (A), la distance parcourue (B) et le temps mis à retrouver la plateforme immergée (C) sont mesurés chez les animaux contrôles et supplémentés en ALA. Au 18ème jour, la plateforme est retirée et le temps passé dans chaque cadrant de la piscine (D), ainsi que le nombre de passages dans la zone exacte où se trouvait cette plateforme (E) sont mesurés. Des profils de nage représentatifs (F) illustrent la différence de stratégie de recherche de la plateforme par les souris supplémentées en ALA. (G) Le "Cue Test" effectué après le 18ème jour, a permis de contrôler l'absence de déficits visio-moteurs, en mesurant le temps mis à trouver la plateforme visible. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n=15 par groupe). *p<0,05 par rapport au régime contrôle, et ($) indique un effet groupe entre les régimes durant la période d'apprentissage ($$p$<0,05).

B. La supplémentation nutritionnelle intraveineuse en ALA et la récupération fonctionnelle post-ischémique.

L'étape suivante fut l'étude de l'effet de la supplémentation nutritionnelle en ALA sur la récupération fonctionnelle, apportée cette fois-ci par voie intraveineuse, après la survenue de l'AVC. Cette étude représente un intérêt majeur en vue d'une translation clinique. Pour cela, la supplémentation nutritionnelle a été réalisée par des injections *i.v* d'ALA (500nmol/kg) 2h, 3j, 7j, 10j, 14j, 17j et 21j après l'AVC. Ce protocole a été adapté à partir d'un protocole établi préalablement au laboratoire pour réduire la taille de la lésion et le taux de mortalité après une MCAo de 60 min (Blondeau et al., 2009; Heurteaux et al., 2006). J'ai donc évalué l'effet de cette supplémentation i.v sur la récupération fonctionnelle après une MCAo de 30 min.

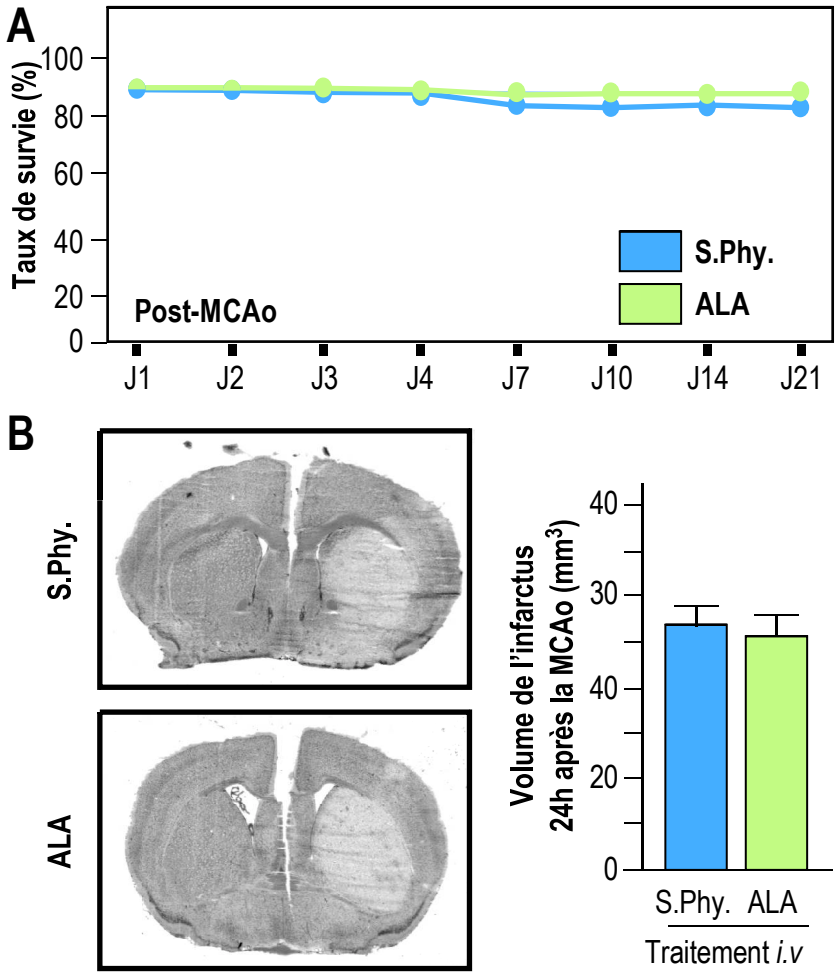


Figure 22 : Effet de la supplémentation *i.v* en ALA sur la survie et l'infarctus cérébral après une MCAo de 30 min.
(A) Représentation graphique du taux de survie à long-terme des animaux. (B) Mesure de la taille de la lésion cérébrale, 24h après une MCAo de 30 min. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n=30 par groupe).

Le taux de mortalité et le volume lésionnel, induits par la MCAo de 30 min, chez les souris traitées avec l'ALA ou son véhicule, le sérum physiologique (S.Phy.) (figure 22A et 22B) étaient similaires à ceux obtenus avec les régimes standard et enrichi en ALA (figure 19A et 19B). La supplémentation *i.v* n'influence pas le taux de mortalité et le volume lésionnel après une MCAo de 30 min.

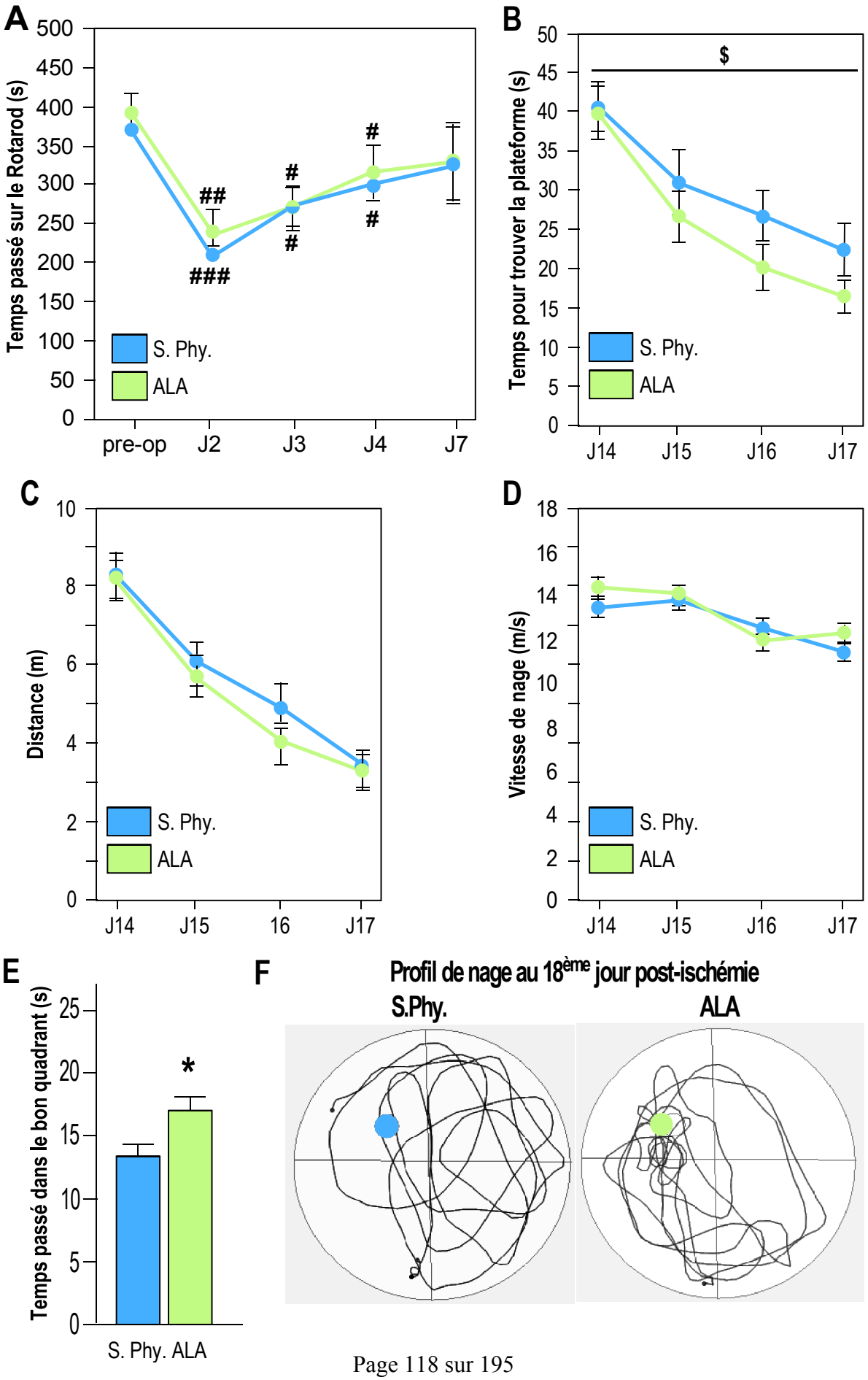

A
Temps passé sur le Rotarod (s)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
##
###
#
#
#
#
S. Phy.
ALA
pre-op
J2
J3
J4
J7
B
Temps pour trouver la plateforme (s)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
$
S. Phy.
ALA
J14
J15
J16
J17
C
Distance (m)
10
8
6
4
2
0
S. Phy.
ALA
J14
J15
16
J17
D
Vitesse de nage (m/s)
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
S. Phy.
ALA
J14
J15
J16
J17
E
Temps passé dans le bon quadrant (s)
25
20
15
10
5
0
*
S. Phy. ALA
F
Profil de nage au 18ème jour post-ischémie
S.Phy.
ALA

Figure 23 : Effet de la supplémentation *i.v* en ALA sur la récupération motrice et cognitive post-ischémie, évaluée par le test du rotarod et de la piscine de Morris.
(A) Graphique représentant le temps passé sur le Rotarod durant la 1ère semaine post-ischémique. Entre le 14ème et le 17ème jour après la MCAo, le temps mis à retrouver la plateforme immergée (B), la vitesse de nages (C) et la distance parcourue (D) sont mesurés chez les animaux supplémentés ou non en ALA. (E) Au 18ème jour, la plateforme est retirée et le temps passé dans chaque cadrant de la piscine est mesuré. (F) Des profils de nage représentatifs illustrent la différence de stratégie de recherche de la plateforme par les souris supplémentées en ALA. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n=15 par groupe). *$p<0,05$ par rapport au S.Phy., et ($) indique un effet groupe durant la période d'apprentissage ($$p<0,05$).

J'ai donc étudié l'effet de la supplémentation nutritionnelle en ALA, par voie *i.v*, sur la récupération motrice après l'induction de l'ischémie cérébrale transitoire. J'ai utilisé les mêmes tests moteurs à savoir le test du *Rotarod* et celui du *mât*.

La figure 23A montre que la supplémentation *i.v* en ALA – selon le protocole mis en place à savoir deux injections en *i.v* d'ALA, 2 heures et pendant 3 jours après la MCAo – ne suffisait pas à promouvoir la récupération motrice spontanée des animaux après une MCAo de 30 min. Si la supplémentation nutritionnelle en ALA, par un régime enrichi, a permis d'améliorer significativement la motricité des animaux lors de la première semaine post-ischémie, il n'en a pas été de même pour la supplémentation par voie *i.v*.

Or, les bénéfices, obtenus par le régime enrichi en ALA, suggèrent qu'un apport d'ALA peut influencer la récupération motrice post-AVC. Il est donc envisageable qu'une amélioration de notre protocole de supplémentation *i.v* pour apporter plus et/ou plus régulièrement de l'ALA puisse également permettre une meilleure récupération motrice post-ischémie. Une perfusion *i.v* en ALA par l'implantation d'une mini-pompe osmotique pourrait ainsi être envisagée. A l'inverse, si l'approche préventive du régime enrichi en ALA a permis d'améliorer la récupération motrice post-ischémie, il n'est pas certain qu'elle puisse apporter les mêmes bénéfices si elle était uniquement mis en place après l'AVC. En effet, nos études préalables suggèrent que le délai de mise en place de la protection cérébrale par la supplémentation orale est clairement plus long que celui par la supplémentation *i.v*. Il se pourrait que les mécanismes recrutés dans cette fenêtre de temps soient différents, surtout en ce qui concerne la récupération motrice qui s'évalue la première semaine post-AVC dans le modèle murin. Ainsi, bien que prometteuse, aborder la supplémentation orale en tant qu'approche curative nécessitera des ajustements en terme de dose et de durée de traitement.

J'ai ensuite étudié l'effet de la supplémentation nutritionnelle en ALA, par voie *i.v*, sur la récupération cognitive après l'induction de l'ischémie cérébrale transitoire. Si deux injections en *i.v* d'ALA, 2 heures et pendant 3 jours après la MCAo – ne suffisaient pas à

promouvoir la récupération motrice spontanée des animaux après une MCAo de 30 min, des injections répétées *i.v* –tous les 3/4 jours– d'ALA sur 2 semaines, permettaient d'améliorer l'autre aspect de la récupération fonctionnelle, la cognition. En effet, dans le test de la piscine de Morris, les souris supplémentées en ALA, par voie *i.v*, trouvaient plus rapidement la plateforme comparée aux souris traitées au sérum physiologique, durant la phase d'habituation (figure 23B). Cette amélioration est indépendante des fonctions motrices des animaux, puisqu'aucune différence n'a été observée, entre les souris traitées et non traitées à l'ALA, sur la vitesse de nage et la distance parcourue (figure 23C et 23D). De plus, la capacité de mémorisation étant supérieure chez les souris traitées à l'ALA comparée au S.Phy. (figure 23E) et celle-ci présentaient aussi une meilleure stratégie de recherche de la plateforme (figure 23F).

Nos résultats, dans un modèle d'ischémie murin, établissent qu'un support nutritionnel en ALA, par voie i.v, présente un intérêt pour améliorer la récupération spontanée de l'apprentissage et la mémoire spatiale.

Ces résultats m'ont ensuite conduit à étudier les **processus cellulaires et physiologiques** qui pourraient être impliqués dans l'amélioration de la récupération fonctionnelle, observée chez les animaux supplémentés en ALA.

C. Processus cellulaires et physiologiques potentiellement impliqués dans l'amélioration de la récupération fonctionnelle, apportée par la supplémentation nutritionnelle en ALA

Dans un premier temps, la récupération motrice post-AVC est décrite pour être influencée par la lésion cérébrale, et notamment sa taille. Vingt-quatre heures après la MCAo, la taille « globale » de la lésion cérébrale est réduite par les deux types de supplémentation en ALA, lorsqu'elle est induite par une occlusion de 60 min, mais pas pour une occlusion de 30 min. Nous avons donc étudié si la supplémentation pouvait influencer la maturation de l'infarctus et avoir un impact sur l'évolution de la lésion cérébrale. Au 3ème jour après la MCAo de 30 min, lorsque le régime enrichi en ALA améliore la récupération motrice, comme il n'existait pas de différence dans la taille de l'infarctus évaluée « approximativement » par la coloration des corps de Nissl au crésyl violet, nous avons décidé d'étudier de manière plus précise l'effet de la supplémentation en ALA sur la survie neuronale. Celle-ci a été quantifiée

à partir d'un marquage immunohistochimique spécifique des neurones avec un anticorps ciblant la protéine NeuN (NEUronal Nuclei). Je me suis intéressé au cortex, au striatum et aux neurones du noyau caudé et du putamen, ces derniers étant impliqués dans le contrôle et la coordination motrice (Evarts and Wise, 1984; Ward et al., 2012). Au 3ème jour après l'ischémie de 30 min, la mort neuronale restait localisée dans le striatum et celle-ci était identique entre les animaux nourris avec le régime enrichi en ALA et ceux nourris avec le régime standard (figure 24A et 24B). Le nombre de neurones marqués positivement au NeuN, observés dans le noyau caudé et le putamen, était similaire entre les différents groupes (figure 24B). Des résultats similaires ont été obtenus avec le traitement subchronique en ALA (données non montrées).

Ces résultats suggèrent que les deux types de supplémentation en ALA que nous avons réalisé n'ont pas d'impact sur la lésion cérébrale globale ou de la région caudate-putamen, après une MCAo de 30 min. L'amélioration de la récupération motrice obtenue avec le régime enrichi en ALA serait donc indépendante d'un effet sur la lésion cérébrale.

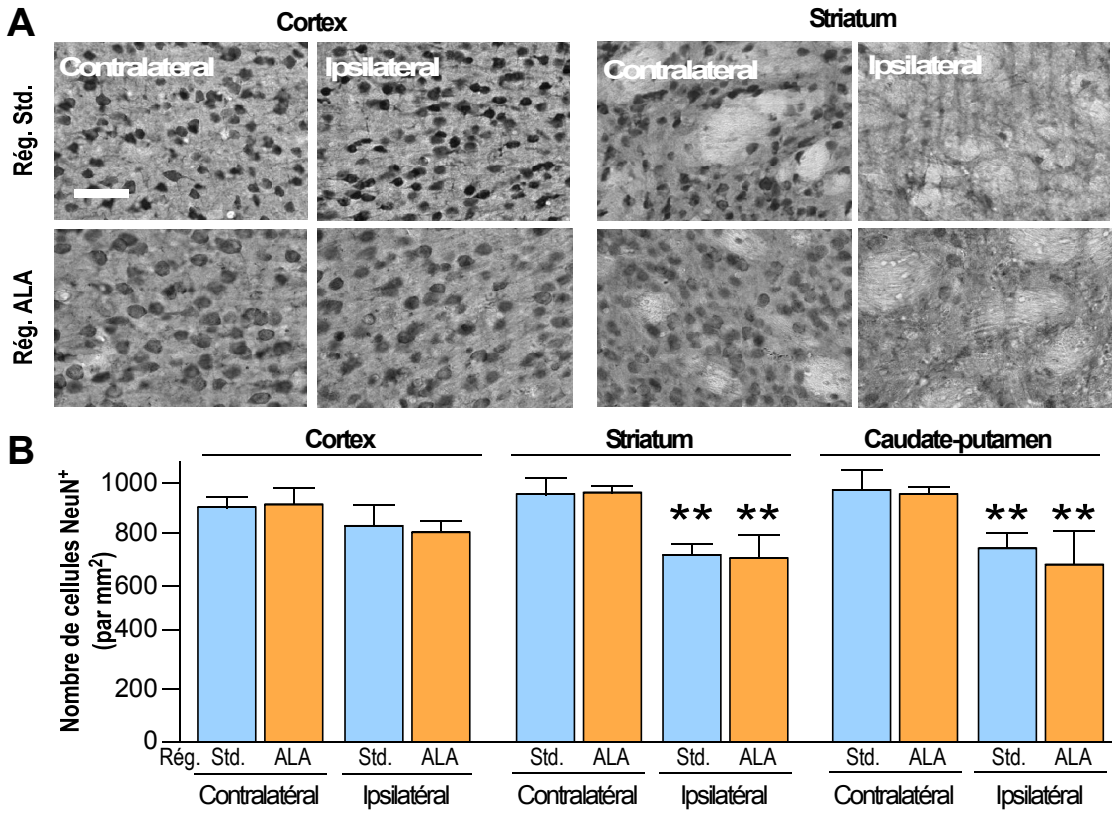


Figure 24 : Effet de la supplémentation orale en ALA sur la perte neuronale induite par une MCAo de 30 min.
(A) Photographie représentant un immunomarquage NeuN (un marqueur neuronal) effectué sur des coupes de cerveaux, 3 jours après une MCAo de 30 min. (B) Histogramme représentant la quantification des cellules $NeuN^+$ dans le cortex, le striatum et le caudate-putamen. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n = 6 par groupe). $^{**}p$ <0,001 par rapport à l'hémisphère controlatéral respectif. La barre d'échelle est de 50 µm, applicables à toutes les coupes.

Le poids est un paramètre présentant des interconnections fortes entre AVC et nutrition, autre thématique prépondérante de mon projet de recherche. La forte prise de poids et surtout l'obésité sont des facteurs nutritionnels augmentant le risque d'AVC. Inversement, l'AVC a des conséquences nutritionnelles relevant de la dénutrition et des troubles de l'alimentation. Celles-ci peuvent avoir un impact très important sur la récupération post-AVC et sur la qualité de vie du patient. Une forte perte de poids est communément observée après un AVC, y compris chez les patients en bonne condition physique avant la survenue de l'AVC (Jonsson et al., 2008). Cette perte de poids qui apparaît dans plus d'un quart des cas est considérée comme un marqueur de mauvais pronostic (Collaboration, 2003).

J'ai donc évalué l'effet des supplémentations nutritionnelles en ALA sur le poids corporel post-ischémique. Notre modèle d'ischémie cérébrale entrainait une perte de poids similaire (environ 12%) dans tous les groupes d'animaux le premier jour après l'ischémie

(figure 25A et 25B). Pourtant, le temps mis pour atteindre le niveau de base (qui dépend habituellement de la durée et de la sévérité de l'ischémie) était inférieur chez les animaux nourris avec le régime enrichi en ALA. Cette réduction était observée durant la première semaine après l'ischémie cérébrale, coïncidant avec la récupération spontanée de la fonction motrice. Cela pourrait expliquer la différence d'effet observée entre la supplémentation orale et *i.v*, où seule la supplémentation orale améliore la récupération motrice post-MCAo (figure 20).

Cela soulève aussi l'hypothèse d'une possible importance du métabolisme dans les effets bénéfiques de la supplémentation en ALA, qui n'a jusque-là jamais été envisagée. Un effet de la supplémentation en ALA sur le métabolisme post-ischémique serait envisageable, car l'AVC et l'ALA influencent de nombreux facteurs et voies métaboliques. L'AVC entraine une augmentation du catabolisme et une diminution de l'anabolisme qui entrainent une pénurie énergétique conduisant à une fonte musculaire et de la masse graisseuse, contribuant tous deux à la perte de poids (Gariballa et al., 1998a). Les leçons du « paradoxe de l'obésité » suggérant que les patients qui présentent une légère obésité (surcharge pondérale) pourraient avoir un meilleur pronostic post AVC, sous-tendent un lien entre la régulation du poids corporel et la récupération après un AVC. Ainsi, traiter le déséquilibre catabolique/anabolique après l'AVC pourrait améliorer l'issue à long terme (Scherbakov et al., 2011). De plus, l'ALA est impliqué dans le métabolisme, en interagissant directement avec des récepteurs nucléaires, tels que le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR) (Forman et al., 1997) et les récepteurs des oxystérols (LXR), et donc l'ALA est impliqué dans la régulation homéostasique et métabolique du glucose et des lipides (Contreras et al., 2013). Bien que d'autres études soient nécessaires, il est tentant de conclure que le soutien nutritionnel post-AVC en ALA peut être une source d'énergie importante et nécessaire pour le soutien métabolique qui pourrait améliorer le regain du poids corporel à court terme et la récupération motrice post-AVC.

L'importance de la perte du poids corporel post-AVC et sa possible régulation par l'ALA m'a conduit à m'intéresser aux mécanismes impliqués dans la perte de poids induite par une situation pathophysiologique inflammatoire aigue du système nerveux central (cf. dans la partie Résultats, Chapitre II, ci-après)

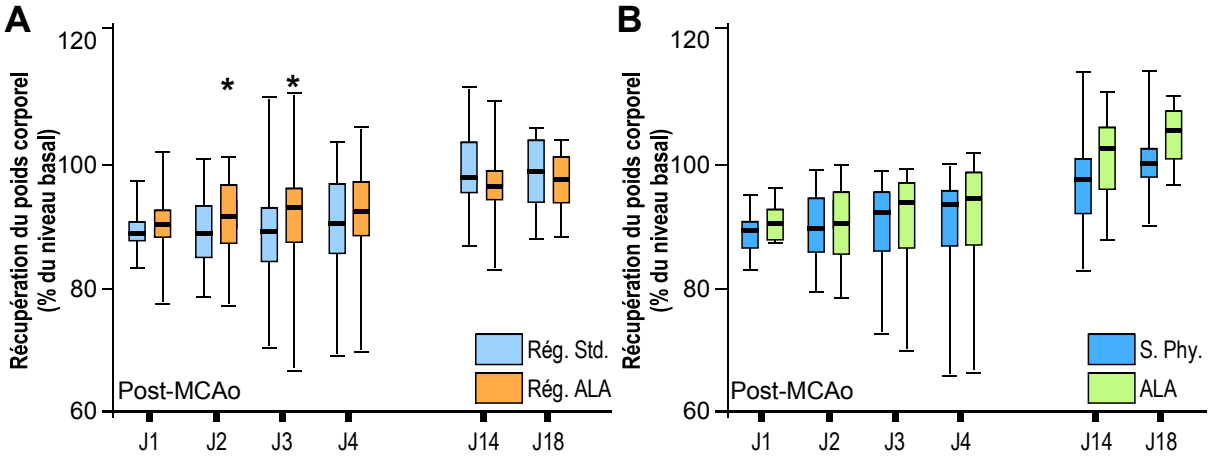


Figure 25 : Effet de la supplémentation orale et *i.v* en ALA sur la perte de poids corporel induite par une MCAo de 30 min.
Diagrammes représentant la perte de poids corporel post-ischémie des animaux supplémentés ou non par voie orale (A) et par voie intraveineuse (B). Les données sont représentées par un diagramme en boîte, les moustaches représentant les valeurs min et max. (*p<0,05 ; n>30 par groupes ; test t de student non apparié).

Dans un second temps, la récupération cognitive post-ischémique est aussi décrite pour être influencée par l'intégrité de certaines structures cérébrales. Pour évaluer la maturation de la lésion cérébrale à long-terme, j'ai mesuré l'atrophie cérébrale des animaux au 21ème jour après l'ischémie. La forte perte tissulaire (12%) qui était observable dans l'hémisphère ischémié des animaux nourris avec le régime standard était fortement réduite dans l'hémisphère ischémié des animaux nourris avec le régime enrichi en ALA (figure 26A). Une profonde atrophie d'amplitude similaire était également observée dans l'hémisphère ischémié des animaux injectés en *i.v* mais non supplémentés en ALA (figure 26B). Cette atrophie était aussi fortement réduite (30%) par la supplémentation *i.v* en ALA (figure 26B). Ces résultats suggérant que les deux types de supplémentation pouvaient avoir un effet protecteur sur la maturation de la lésion cérébrale, j'ai étudié si elles pouvaient avoir un effet neuroprotecteur sur l'hippocampe, zone d'importance dans la mémoire et dont les dommages sont associés à des déficits mnésiques décelables dans le test de la piscine de Morris (Morris et al., 1982). De plus, les effets neuroprotecteurs sur l'hippocampe d'une injection *i.v* d'ALA ayant déjà été mis en évidence 24h après une ischémie globale transitoire chez le rat (Lauritzen et al., 2000), un effet bénéfique sur les dommages à long-terme de cette structure semblait envisageable. Par une coloration au crésyl violet, j'ai montré que 30 min de MCAo induisaient des lésions importantes au niveau de l'hippocampe, 21 jours après l'ischémie. En effet, 45% et 30% des neurones étaient détruits dans l'hippocampe ischémié des animaux nourris avec le régime standard et ceux traités au sérum physiologique, respectivement (données non montrées). La supplémentation orale en ALA réduisait significativement de

42% la perte neuronale dans l'hippocampe ischémié comparé au régime standard (figure 26C). De même, la supplémentation *i.v* en ALA réduisait également la mort des neurones dans l'hippocampe par rapport au traitement au sérum physiologique (figure 26C). La meilleure préservation des couches du CA1 et CA3 de l'hippocampe des animaux supplémentés en ALA est illustrée par les microphotographies de la figure 26D.

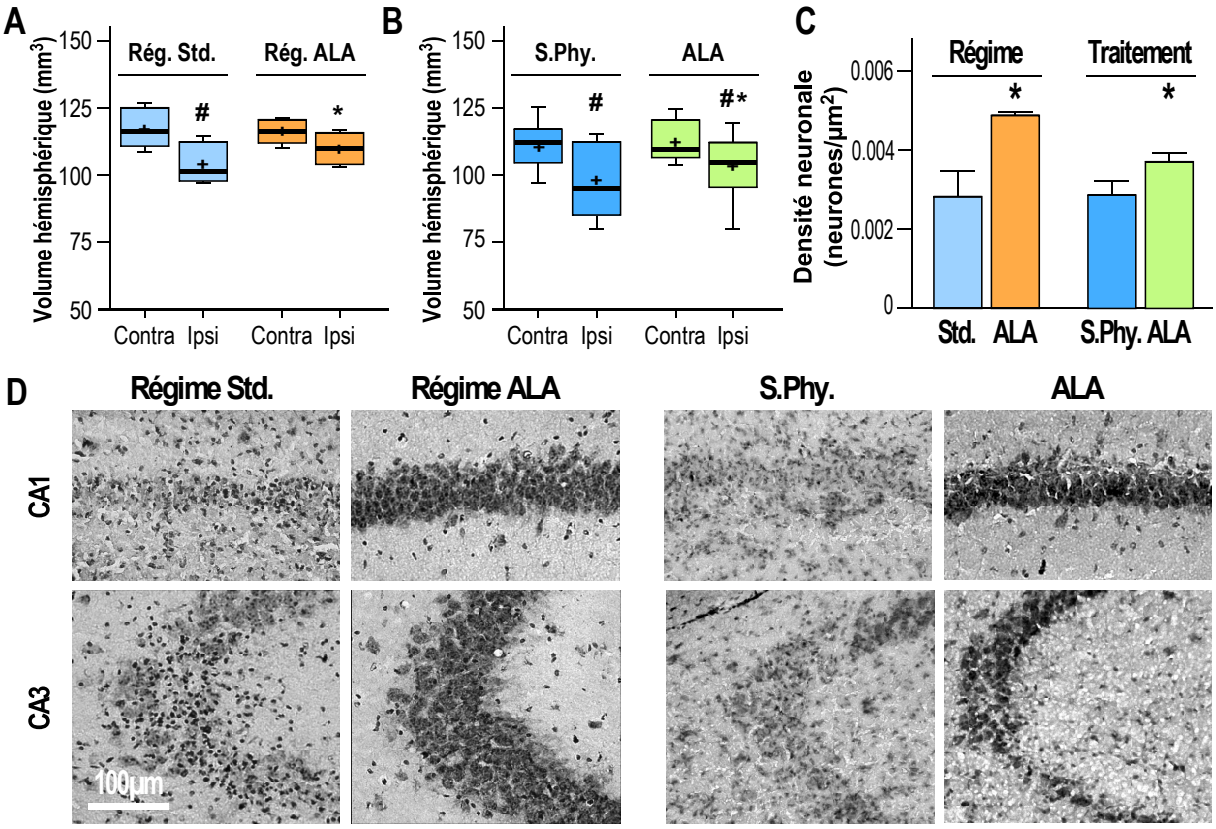


Figure 26 : Effet de la supplémentation orale et *i.v* en ALA sur l'atrophie cérébrale et la perte neuronale hippocampique induite par une MCAo de 30 min.
(A et B) Diagramme représentant le volume hémisphérique contralatéral et ipsilatéral des animaux supplémentés ou non en ALA, au 21ème jour après l'ischémie. Les données sont représentées par un diagramme en boîte, les moustaches représentant les valeurs min et max, et le "+" représentant la moyenne (n=6 par groupe) #$p < 0,05$ *versus* l'hémisphère controlatéral respectif, et *$p < 0,05$ *versus* le contrôle respectif. (C) Histogramme représentant la perte neuronale dans l'hippocampe des animaux supplémentés ou non en ALA, au 21ème jour après la MCAo de 30 min. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n=6 par groupe) *$p < 0,05$. (D) Coloration au crésyl violet représentant la lésion hippocampique 21 jours après la MCAo.

L'important effet neuroprotecteur des deux types de supplémentation en ALA au niveau de la lésion hippocampique observée 3 semaines après l'ischémie est indéniablement un facteur crucial dans l'amélioration de la récupération cognitive mise en évidence dans le test de la piscine de Morris.

De plus, mon laboratoire d'accueil et d'autres équipes ont montré que l'injection de l'ALA et un régime enrichi en ALA entrainent la neurogenèse et la synaptogenèse dans le cerveau adulte (Nguemeni et al., 2010; Venna et al., 2009). La plasticité cérébrale étant fortement impliquée dans la récupération fonctionnelle (Kleim and Jones, 2008; Murphy and Corbett, 2009), une relation de causalité entre la plasticité cérébrale induite par la supplémentation nutritionnelle en ALA et la récupération cognitive semble concevable.

Nous ne pouvons pas non plus exclure un effet anti-inflammatoire de la supplémentation en ALA, permettant une amélioration de la récupération fonctionnelle post-AVC. La neuroinflammation post-ischémique est clairement impliquée dans les dommages cérébraux. Elle serait également associée à un pronostic défavorable et une moindre récupération fonctionnelle post-AVC (Allan et al., 2005; Drake et al., 2011). De plus, dans un modèle expérimental d'hypoxie/ischémie cérébrale, les effets anti-inflammatoires des AGPIs ω-3 à LC sont bénéfiques (Zhang et al., 2010). En effet, cette étude a montré qu'une supplémentation nutritionnelle en EPA/DHA améliore le pronostic neurologique après un stress hypoxique et ischémique. Cette amélioration est associée à une réduction de la neuroinflammation *via* la microglie (Zhang et al., 2010). Ainsi, à l'heure de la rédaction de ce manuscrit, l'effet de nos supplémentations nutritionnelles en ALA sur la neuroinflammation post-ischémique constitue mon troisième axe d'étude.

Enfin, en terme mécanistique, une des premières questions systématiquement posées est de savoir si les effets bénéfiques de l'ALA sont des effets propres à celui-ci ou s'ils passent par sa bioconversion notamment en d'autres ω-3, décrits eux aussi pour avoir des effets bénéfiques (l'ALA étant le précurseur des ω-3 à LC). Pour étudier l'éventuelle modification des concentrations cérébrales en acides gras suites aux différentes supplémentations en l'absence d'ischémie (figure 27), des analyses lipidomiques ont été réalisée par le Pr. Michel Guichardant et Mme. Patricia Daira sur la plateforme lipidomique IbiSA de l'institut Carnot-LISA.

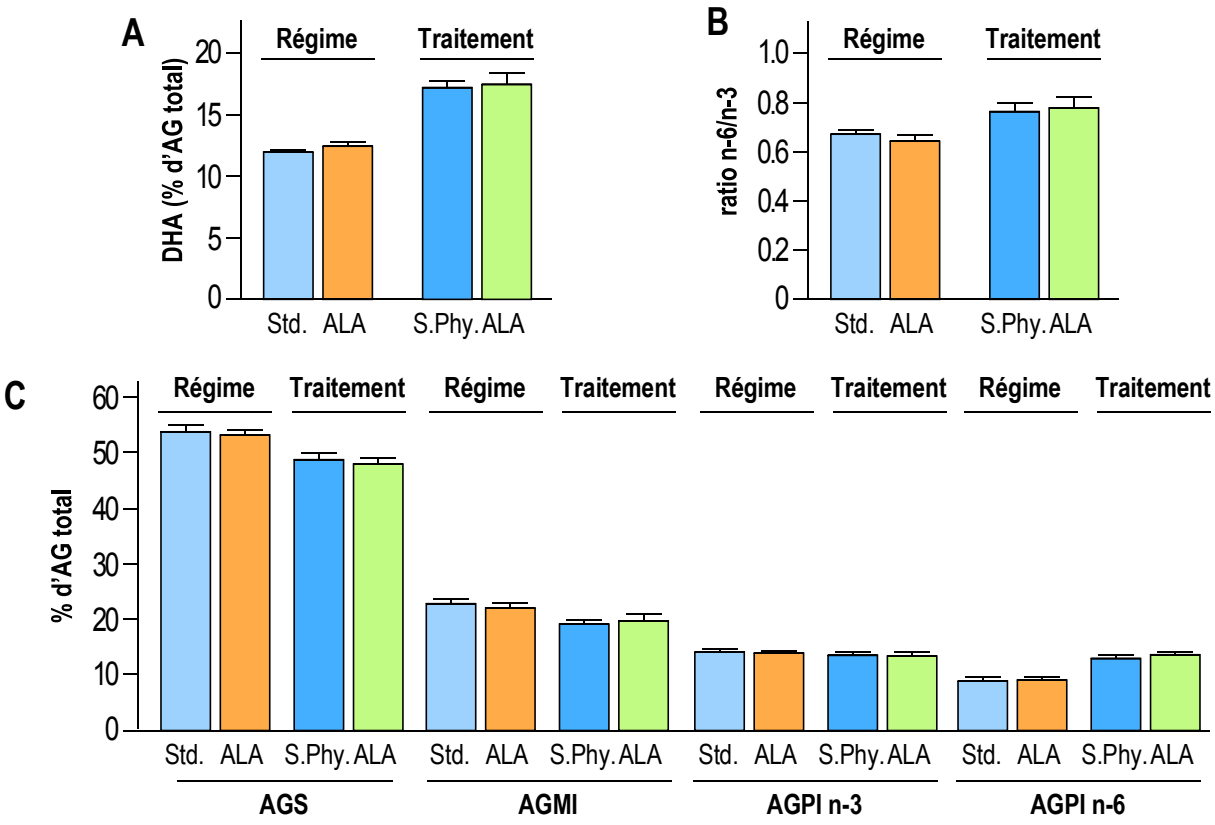


Figure 27 : Effet de la supplémentation orale et *i.v* en ALA sur la composition cérébrale en acide gras pré-ischémique.
(A) Histogrammes représentant la concentration cérébrale en DHA, l'AGPI n-3 majoritaire dans le cerveau (A), le ratio oméga-6/oméga-3 (B) et la concentration en acides gras saturés, mono-insaturés, poly-insaturés oméga-3 et oméga-6 (C) dans le cerveau des animaux supplémentés ou non en ALA. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n=5 par groupe).

La supplémentation en ALA qu'elle soit orale ou *i.v* n'augmentait pas la concentration cérébrale en DHA (figure 27A). La consommation du régime enrichi en ALA et le traitement subchronique en ALA ne modifiaient pas non plus le ratio ω-6/ω-3 (figure 27B), ni la concentration des acides gras saturés, mono- et polyinsaturés (ω-3 et ω-6) (figure 27C).

Les effets bénéfiques obtenus par la supplémentation en ALA sur la récupération fonctionnelle ne seraient donc pas dus à un enrichissement des membranes cérébrales en un de ses dérivés à longue chaine, comme le DHA, ce qui conforte l'idée de l'intérêt d'un traitement enrichi en ALA face à l'AVC.

II. La supplémentation nutritionnelle en ALA réduit l'expression post-ischémique de CCL2 et ses conséquences neurotoxiques et inflammatoires.

Lors de la première mise en évidence de l'effet protecteur d'une supplémentation nutritionnelle en ALA sur les dommages cérébraux induits par l'AVC, nos résultats montraient que la neuroprotection induite par le régime enrichi en ALA (régime 0,75% ALA *vs* régime standard à 0,25% ALA) était associée à une diminution de la péroxydation lipidique et du stress oxydant post-ischémique (e.g. 24h après une MCAo de 60 min) (Nguemeni et al., 2010).

Lors de l'ischémie, la production excessive de radicaux libres et de produits de péroxydation est concomitante à la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL1-β, IL-6, TNF-α) et de chimiokines (CCL2, MIP-1-α, IL-8) (Conductier et al., 2013; Le Thuc et al., 2015). Ces facteurs pro-inflammatoires, notamment TNF-α, sont neurotoxiques, lorsqu'ils atteignent un niveau pathophysiologique. Ils menacent la survie neuronale dans la pénombre ischémique et contribuent à l'expansion de l'infarctus ischémique. L'inflammation post-ischémique amplifie les dommages du tissu cérébral induit par l'attaque cérébrale, par une action directe sur les neurones. De plus, l'AVC ischémique est aussi un exemple caractéristique du rôle toxique que peut jouer l'inflammation dans une pathologie. L'activation de la microglie, l'altération de la barrière hémato-encéphalique et le recrutement des cellules immunitaires dans le parenchyme cérébral, ont pour conséquence l'amplification du processus inflammatoire, le relargage de radicaux libres de l'oxygène et d'enzymes protéolytiques comme MMP-9 (une protéase connue pour dégrader la lame basale et contribuer activement à la dégradation de la BHE) (cf. Chapitre I.D.3). Ce processus destructeur est contrôlé par des cytokines inflammatoires à fort pouvoir chimio-attractant : les chimiokines. Les chimiokines comme IL-8 et CCL2 sont produites dans le cerveau lésé pour y guider la migration des cellules inflammatoires (cf. Chapitre I.D.4.d).

Limiter l'expression de médiateurs pro-inflammatoires spécifiques après l'AVC est une solution thérapeutique retenant l'attention de nombreux chercheurs par son côté novateur. Or, certaines études épidémiologiques associent le taux sérique d'AGPIs en général et d'ω-3 en particulier, au niveau d'expression des marqueurs inflammatoires. Une étude menée sur une population de 1123 personnes âgées de 20-98 ans, a associé l'augmentation du taux plasmatique des ω-3 à des niveaux faibles de marqueurs pro-inflammatoires (IL-6, TNF-α) et

des niveaux plus élevés de marqueurs anti-inflammatoires (IL-6R, IL-10, TGF-ß) (Ferrucci et al., 2006). Cela suggère qu'un régime supplémenté en ALA pourrait avoir un effet bénéfique sur l'inflammation ischémique.

A. Un rôle potentiel de CCL2 dans la protection apportée par la supplémentation nutritionnelle en ALA.

Dans le modèle expérimental utilisé au sein de mon laboratoire d'accueil, l'apport du régime enrichi en ALA permet la réduction de la lésion ischémique 24h après une MCAo de 60 min (figure 28A) (Nguemeni et al., 2010). Dans ce modèle expérimental, nous avons étudié une soixantaine de gènes (cytokines et chimiokines), connus pour être pro-inflammatoires et/ou délétères dans l'ischémie cérébrale et identifié le gène le plus exprimé dans le cortex ipsilatéral 24h après l'ischémie, comme étant le gène codant pour la chimiokine CCL2 (443 fois, $p<0,001$, figure 28B).

L'augmentation de l'expression de son ARNm post-ischémique se démarque d'un facteur 6 à 10 fois plus important que le pool des quatre autres gènes les plus fortement exprimés (CXCL10/IP-10 augmenté 77 fois, CCL7/MCP-3 augmenté 57 fois, CCL4/MIP-1β augmenté 49 fois et CCL3/MIP-1α augmenté 35,8) (figure 28B). Ces quatre chimiokines sont pourtant impliquées dans l'inflammation post-ischémique(Kriz, 2006). D'ailleurs, MIP-1α et MIP-1β partagent le même récepteur CCR5 d'une part, et MCP-3 se lie au même récepteur que CCL2 (CCR2). Les facteurs d'augmentation d'expression post-ischémique des autres gènes pro-inflammatoires ne dépassent pas 20 fois : à titre d'exemple, l'expression du TNF-α, connu pour ces multiples rôles délétères dans l'ischémie est augmenté de 16 fois en comparaison de l'état pré-ischémique ($p<0,001$).

Chez l'Homme, CCL2 est surexprimée dans les heures qui suivent la survenue d'un AVC, au point que l'élévation de son taux sanguin peut être considérée comme un marqueur clinique précoce du développement d'une réponse inflammatoire cérébrale après l'attaque (Reynolds et al., 2003). Chez le rongeur, CCL2 a été identifiée comme la chimiokine clé orchestrant l'infiltration délétère des neutrophiles dans les 24 heures qui suivent l'ischémie cérébrale (Dirnagl et al., 1999; Le Thuc et al., 2015).

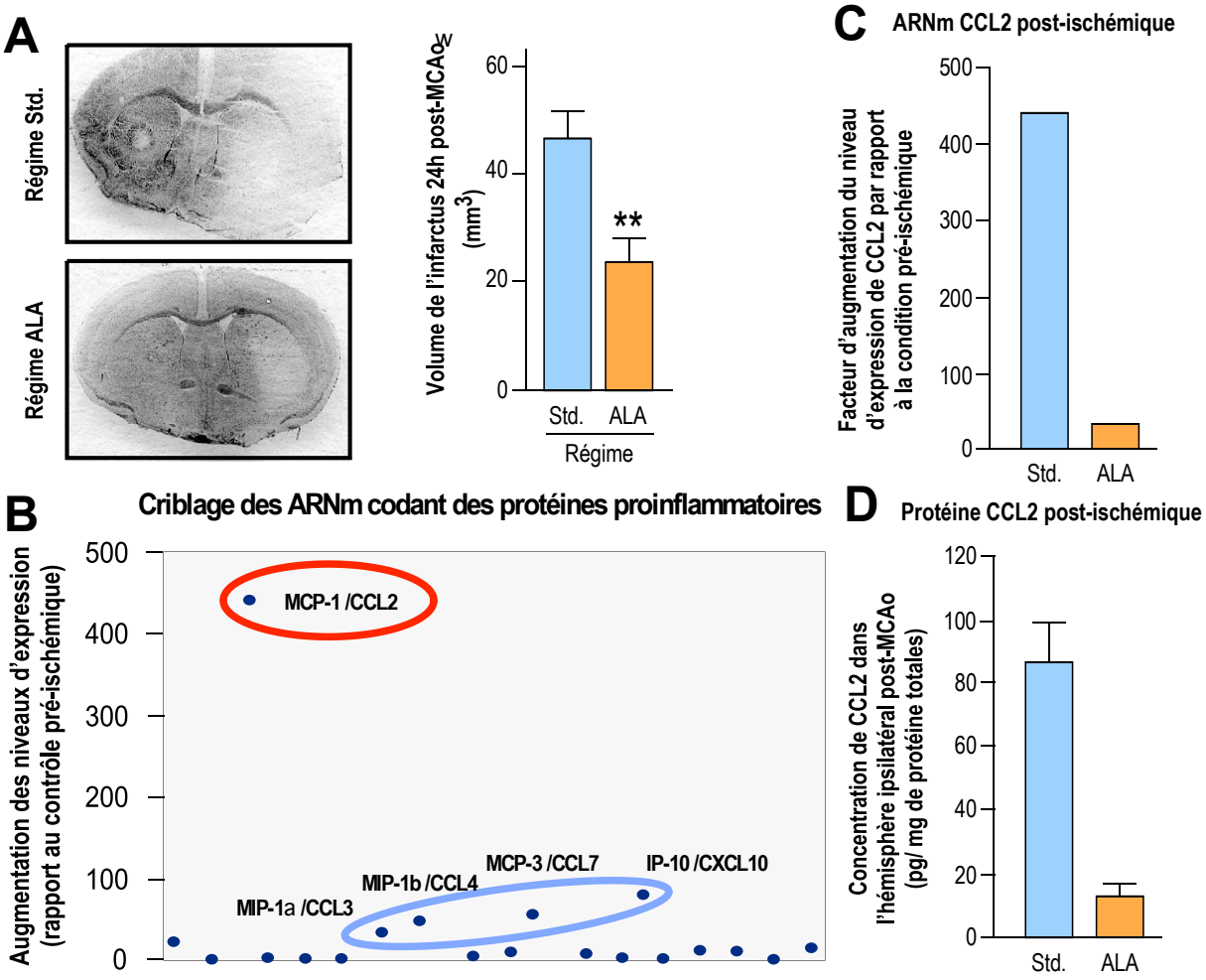


Figure 28 : L'expression de la chimiokine CCL2 est associée à la protection obtenue par la supplémentation orale en ALA après une MCAo de 60min.
(A) Mesure de la taille de la lésion cérébrale, 24h après une MCAo de 60 min (n=35 par groupe). (B) Expression du transcrit codant pour CCL2 24h après l'ischémie en comparaison avec 4 autres chimiokines. Expression génique (C) et protéique (D) de la chimiokine CCL2 dans l'hémisphère ipsilatéral des souris ischémiées. . Les données sont représentées par la moyenne ± SEM. $^{**}p < 0{,}01$. * comparé à la condition standard.

Nous avons donc concentré nos efforts sur cette chimiokine pro-inflammatoire. Nous avons étudié si la supplémentation en ALA par la consommation du régime enrichi en ALA est ou non associée à une modification de l'expression post-ischémique de CCL2. Pour cela nous avons analysé l'expression des ARNm corticaux des souris, nourries pendant 6 semaines avec les différents régimes, par la technique de Reverse Transcription et PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR). Cette méthode est la plus sensible et fiable pour mesurer et comparer l'expression génique en quantifiant le taux d'ARNm. Nos résultats préliminaires suggèrent que 24 heures après une MCAo de 60 min, l'expression de l'ARNm de la chimiokine CCL2 était réduite d'environ d'un facteur 13 (figure 28C) par le régime enrichi en ALA en comparaison du régime standard, dans le cortex ipsilatéral des souris. De même, nous avons

évalué l'expression protéique de cette chimiokine dans le cortex ipsilatéral, 24 heures après l'ischémie, par la technique de cytométrie de flux. L'expression protéique de CCL2 post-ischémique était également réduite significativement d'un facteur 7 (figure 28D). Ce résultat souligne encore l'importance probable de cette chimiokine dans les dommages ischémiques.

La surexpression de CCL2 est retrouvée dans différents modèles animaux d'ischémie cérébrale focale permanente ou transitoire (Kriz, 2006). Pourtant, à ce jour, son rôle reste controversé, car son inhibition par différentes techniques expérimentales (dominant négatif, immunoneutralisation, souris déficiente génétiquement pour le gène CCL2) a conduit soit à la réduction, soit à l'aggravation des dommages post-AVC (cf. Chapitre I.D.4.d). Pour Kumai et coll., l'inhibition de son expression par dominant négatif, dans un modèle de souris invalidées semble réduire les dommages post-AVC (Kumai et al., 2004), alors que pour l'équipe de Gidday, ni la délétion du gène codant pour CCL2, ni son immunoneutralisation n'est protectrice contre les dommages ischémiques induits par l'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (MCAo) (Wacker et al., 2012). Les infarctus cérébraux tendent même à être plus larges chez les animaux déficients en CCL2. De même, les études *in vitro* enrichissent la controverse. Différentes doses de CCL2 ont été testées de 0,72nM à 100nM, dans différents modèles de stress cellulaire et sur différents types de cultures neuronales (pures ou en présence de cellules gliales ; et provenant de rat, de souris, ou de lignée humaine). Dans ces expériences, CCL2 est tantôt protectrice, délétère ou inactive. Nous avons donc entrepris de caractériser *in vitro* un éventuel potentiel cytotoxique, indépendamment de son pouvoir chimioattractant.

Pour savoir si la diminution de l'expression de CCL2, et non sa délétion totale pouvait être impliquée dans la neuroprotection associée au régime enrichi en ALA, j'ai évalué l'effet de différentes doses de cette chimiokine sur une culture primaire de neurones corticaux dans un modèle de stress ischémique cellulaire, l'OGD (« *Oxygen Glucose Deprivation* ») (figure 2). L'OGD est un modèle d'ischémie *in vitro* qui consiste en la privation transitoire d'oxygène et de glucose, conduisant à un gonflement des neurones en moins de 60 min, suivie d'une dégénérescence neuronale au cours des heures suivant l'OGD, en dépit d'un retour en conditions normales. Cette dégénérescence neuronale induite par l'OGD présente les mêmes caractéristiques que celle observée après un accident ischémique *in vivo*. En effet, c'est également un phénomène dépendant de la concentration calcique extracellulaire, l'OGD

entraine une excitotoxicité avec une libération massive de glutamate dans le milieu extracellulaire et l'activation des récepteurs glutamatergiques NMDA et AMPA (Goldberg and Choi, 1993; Gouix et al., 2014). Une revue exhaustive de la littérature des expériences réalisées *in vitro* suggère aussi un rôle ambivalent de cette protéine. Le rôle neuroprotecteur d'un prétraitement par de très faibles doses de CCL2 (inférieure à 10nM) a été mis en évidence contre différents stress excitotoxiques, y compris dans un modèle d'OGD, alors que des concentrations seulement 5 fois plus grandes (50nM) semblaient suffire à accentuer les dommages excitotoxiques induits par le NMDA et le Glutamate. Ce concept étant en adéquation avec notre idée qu'une réduction de l'expression post-ischémique de CCL2 par le régime enrichi en ALA pouvait être neuroprotectrice et participer à la réduction des dommages neuronaux, j'ai donc testé les doses de 20 et 200nM de CCL2 dans un même paradigme expérimental sur des cultures primaires de neurones corticaux, exposés ou non à une OGD d'une durée de 60 min. Le temps de 60 min a été choisi pour réaliser un parallèle entre les résultats obtenus *in vivo* et *in vitro*. Ces expériences devaient permettre de statuer sur la neurotoxicité de l'expression de CCL2 en conditions physiologique et pathophysiologique et de nous éclairer sur l'éventuel effet d'une modification de la concentration de CCL2 par l'ALA en reproduisant notamment le facteur de réduction de l'expression de CCL2 observé dans nos expériences *in vivo* en fonction de la teneur en ALA des régimes (Figure 28D).

Sur des cultures « pures » de neurones (e.g. 95% de neurones et 5% de cellules gliales), comme sur des cultures mixtes de neurones et d'astrocytes, l'application des doses de 20 et 200 nM de CCL2 n'affectait pas la survie neuronale pendant 24 heures en absence de stress (figure 29). En revanche, la présence de 200nM aggravait sévèrement la mortalité neuronale, contrairement à la concentration de 20nM de CCL2 qui améliorait légèrement la survie neuronale 24h après 60 min d'OGD, comparée à la condition OGD sans la présence de CCL2 (figure 29). Des résultats similaires étaient observables avec des cultures mixtes neurones/astrocytes (figure 29). La présence de CCL2 ne semblait pas neurotoxique en absence de stress, y compris à la dose de 200 nM. Par contre, s'il en était de même en cas d'OGD pour la concentration de 20 nM qui n'affectait pas la mortalité neuronale, l'augmentation de la concentration de CCL2 à 200nM de CCL2 accentuait des dommages neuronaux 24h après 60 min d'OGD (figure 29).

Nos résultats apportent plusieurs pierres à la littérature concernant la dangerosité de CCL2 pour les neurones. Il clarifie l'existence d'effets différents de CCL2 en fonction de sa concentration, des types cellulaires et des conditions expérimentales. CCL2 ne semble pas

être neurotoxique par elle-même. Le fait qu'en faible quantité, elle puisse même être neuroprotectrice *in vitro* explique en partie les controverses sur son effet, et pourquoi son rôle chimiotactique est pressenti comme étant le plus important dans l'extension des dommages neuronaux.

Pour autant, nos résultats établissent clairement qu'une augmentation importante de la concentration de CCL2 est délétère pour les neurones soumis à un stress ischémique, et que la limiter, sans toutefois supprimer totalement la chimiokine du milieu, serait protecteur.

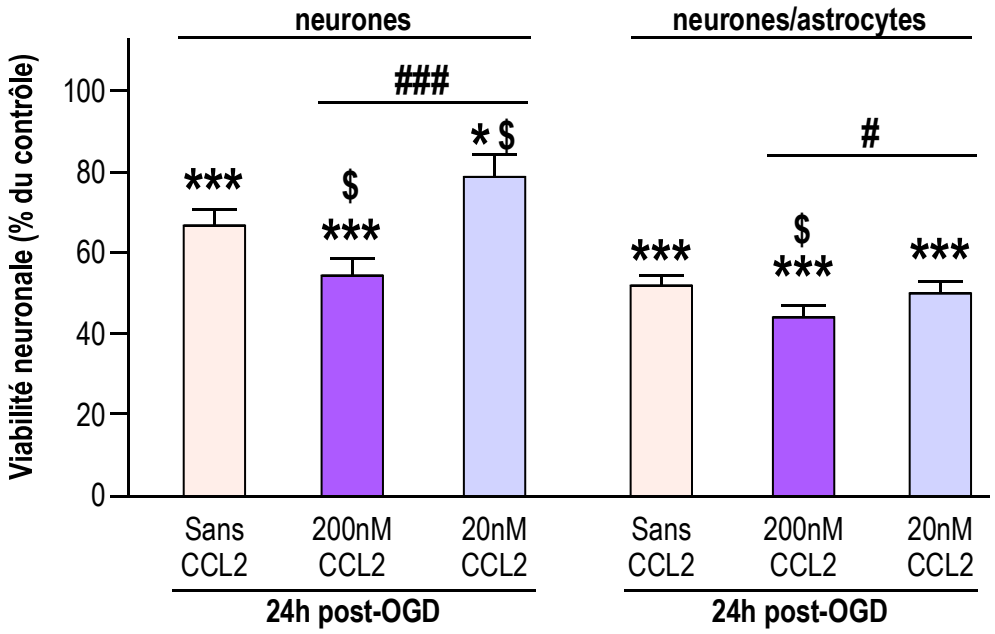


Figure 29 : Effet dose-réponse de CCL2 sur la viabilité neuronale 24 heures après une OGD de 60 min sur des cultures de neurones en présence ou non d'astrocytes.
Effets des différentes doses de CCL2 (20 et 200 nM) sur la viabilité des cultures de neurones pures ou associés aux astrocytes, 24h après un modèle d'ischémie *in vitro*, l'OGD de 60 min.. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM. (*) comparé à la condition contrôle sans OGD, ($) comparé à la condition OGD sans CCL2 et (#) comparé entre les conditions avec CCL2 en condition d'OGD. *, $, # $p < 0,05$; ***, ### $p<0,001$.

Nous nous sommes donc naturellement intéressés à l'éventuelle régulation de l'expression de CCL2 par l'ALA et à sa capacité à protéger les neurones contre l'OGD. J'ai donc étudié l'effet de 100μM d'ALA – dose décrite pour protéger contre différents stress excitotoxiques (Blondeau et al., 2009; Lauritzen et al., 2000) – sur la variabilité neuronale après 60 min d'OGD (figure 30).

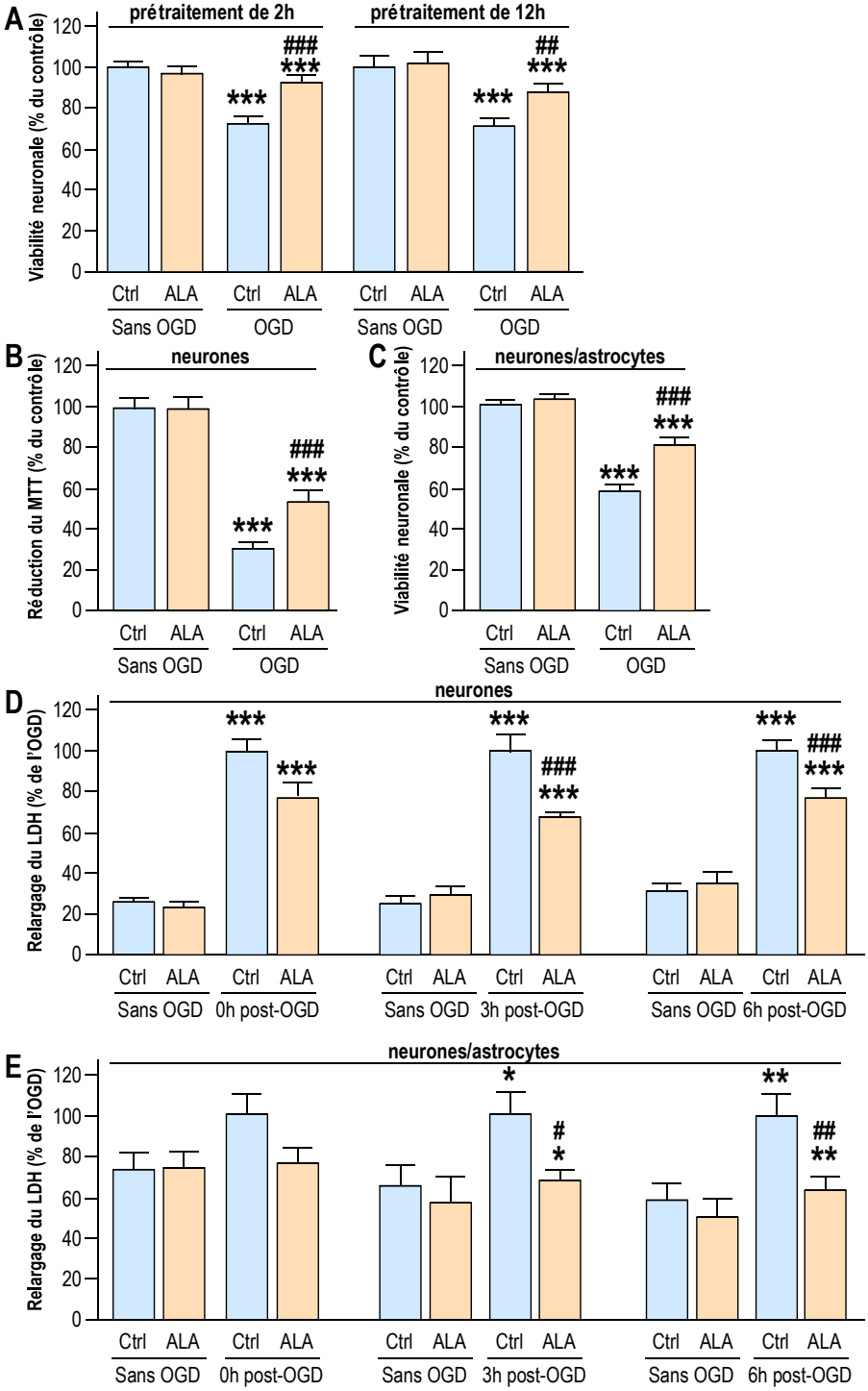


Figure 30 : Effet d'un prétraitement d'ALA (100µM) sur les dommages neuronaux induits par une OGD de 60 min.

(A) Mesure de la viabilité des neurones par un comptage cellulaire, 24h après une OGD de 60 min, avec ou sans prétraitement (de 2 ou 12h) d'ALA à 100µM. (B) Mesure indirecte de la viabilité neuronale par le test du MTT sur une culture "pure" de neurones, 24h après une OGD de 60 min, avec ou sans prétraitement de 2h d'ALA. (C) Viabilité neuronale évaluée par un comptage cellulaire sur des cultures mixtes neurones/astrocytes 24h après une OGD de 60 min, avec ou sans prétraitement de 2h d'ALA. Mesure indirecte de la viabilité cellulaire par le test du LDH sur des cultures "pures" de neurones (D) ou mixtes (E) à différents temps (0, 3 et 6h) après une OGD de 60 min. Les valeurs expérimentales de LDH sont normalisées par rapport à la mortla mort cellulaire observée dans la condtion "ctl OGD". Les données sont représentées par la moyenne ± SEM. * comparé à la condition sans OGD; # comparé à la condition controle OGD.*p<0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; #p<0,05; ##p < 0,01; ###p < 0,001.

Sur des cultures primaires de neurones corticaux « pures » de souris, l'OGD de 60 min entrainait approximativement 30% de mort neuronale (figure 30A), évaluée par comptage cellulaire 24h après l'OGD. Ce point de 24h a été choisi pour pouvoir comparer les résultats de protection cellulaire obtenus *in vivo* et *in vitro*. Cette mortalité induite par l'OGD était réduite d'un tiers par l'application d'un prétraitement de 2 heures d'ALA (100μM). Cette protection a été mise en évidence par plusieurs méthodes dont le classique comptage cellulaire (figure 30A) et le test du MTT (figure 30B). Ce dernier évalue l'activité mitochondriale reflet de la santé cellulaire en mesurant par colorimétrie la formation de cristaux de formazan, un produit de la réduction du tetrazolium par les déshydrogénases mitochondriales. L'OGD de 60 min réduisait l'activité mitochondriale des neurones de plus de 60%, et l'application de l'ALA diminuait significativement cette réduction d'activité cellulaire (figure 30B). De plus, l'augmentation du temps de prétraitement à 12h n'augmentait pas la neuroprotection mise en évidence par comptage des neurones dans des culture « pures » (figure 30A). Comme les neurones en culture mixte étaient aussi protégés d'une OGD de 60min par un prétraitement de 2 heures d'ALA (figure 30C), nous avons donc poursuivi notre étude avec un prétraitement de 2 heures.

La neuroprotection du prétraitement d'ALA contre l'OGD a été confirmée dans les cultures de neurones pures et mixtes (figure 30D et 30E), évaluée par le test du LDH (Lactate DésHydrogénase). L'OGD entrainait une forte libération de l'enzyme LDH dans les 6 premières heures post-OGD (figure 30D). Cette libération de LDH est considérée comme un marqueur indirect de la cytotoxicité. La figure 30D montre que le prétraitement d'ALA (100μM) réduisait la libération de LDH par les neurones. Le pic de libération de LDH était légèrement retardé par la présence d'astrocytes dans les cultures (figure 30E), rappelant le rôle protecteur des astrocytes notamment par leur capacité à capturer le glutamate et limiter l'excitotoxicité.

Nos résultats indiquent qu'un prétraitement de 2h d'ALA protège les neurones face à un stress ischémique in vitro. De plus il semblerait que la présence des astrocytes ne modifie pas la capacité neuroprotectrice de l'ALA.

L'étape suivante a été d'identifier les cellules responsables de la production de la chimiokine CCL2 et de savoir si la neuroprotection apportée par l'ALA pouvait être corrélée à une réduction de l'expression de cette chimiokine dans notre modèle d'AVC *in vitro*.

Pour cela, j'ai quantifié l'expression génique de CCL2 dans des cultures de neurones « pures », d'astrocytes « pures » et dans des cultures mixtes (neurones/astrocytes) à différents temps après une OGD de 60 min (figure 31A). L'OGD entrainait une forte expression de l'ARNm codant CCL2 dans les cultures de neurones (figure 31A). En effet, une augmentation d'un facteur supérieur à 6,5 et à 3 était toujours enregistrée 24 heures après l'OGD dans les cultures de neurones pures et mixtes, respectivement. A noter que si l'OGD n'avait aucun impact sur l'expression génique de CCL2 dans les astrocytes, leur présence ralentissait la production de cette chimiokine par les neurones (figure 31A), soulignant encore une fois le rôle protecteur des astrocytes. J'ai réitéré cette expérience, en prétraitant ou non les cultures cellulaires avec de l'ALA (figure 31B). Nos résultats préliminaires montrent que la surexpression neuronale de CCL2, 24 heures après une OGD, était réduite par 3 lors d'un prétraitement de 2h avec 100μM d'ALA (figure 31B). L'ALA par lui-même est donc capable de réduire la sécrétion de CCL2 par les neurones.

Ces résultats in vitro montrent que l'ALA peut réduire l'expression neuronale de CCL2 qui est neurotoxique dans le stress ischémique. Cela suggère que la réduction de l'effet neurotoxique de CCL2 pourrait être un mécanisme neuroprotecteur de l'ALA. Pour autant, les neurones ne sont pas décrits pour être la source majoritaire de CCL2 après un AVC : la production majoritaire de cette chimiokine étant principalement due aux cellules inflammatoires, dont la microglie activée, principale cellule immunitaire cérébrale (Yan et al., 2007).

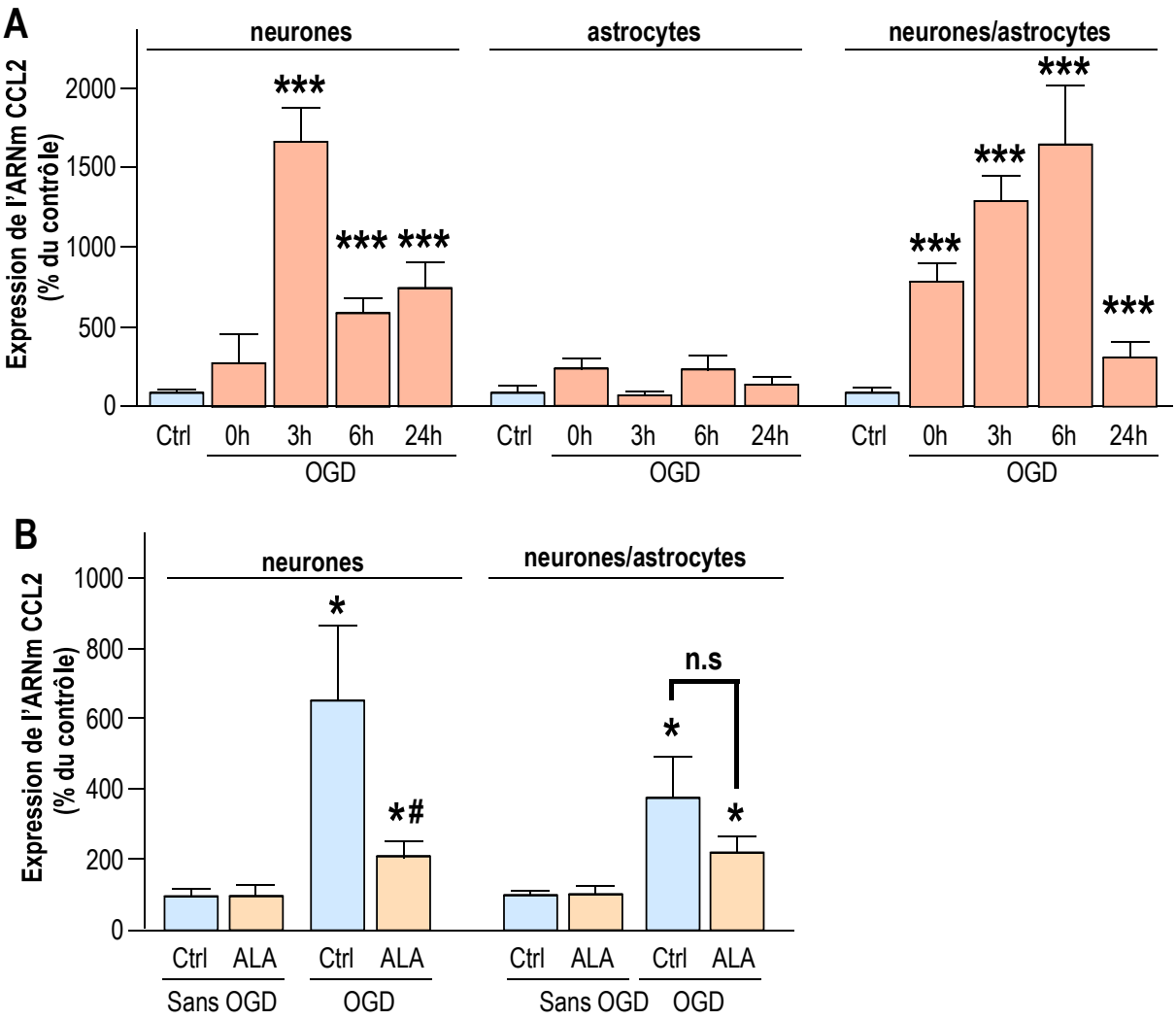


Figure 31 : Effet d'un prétraitement d'ALA (100µM) sur l'expression génique de CCL2 après une OGD de 60 min.
(A) Expression génique de CCL2 dans des cultures de neurones « pures », d'astrocytes « pures » et dans des cultures mixtes (neurones/astrocytes) à différents temps (0, 3, 6 et 24h) après une OGD de 60 min. (B) Expression génique de CCL2 dans des cultures de neurones « pures » et dans des cultures mixtes 24h après une OGD de 60 min, avec ou sans prétraitement d'ALA (100µM). Les données sont représentées par la moyenne ± SEM. (*) comparé à la condition sans OGD; (#) comparé à la condition controle OGD.*p<0,05; ***p < 0,001; #p<0,05.

Comme décrit dans l'introduction du manuscrit (cf. Chapitre I.D.4.a), la microglie est l'une des premières cellules non neuronales à répondre lors d'un AVC ischémique.

In vitro, l'OGD entraine la prolifération, l'activation, augmentation de la synthèse des récepteurs et de médiateurs inflammatoires comme l'expression de CCL2, par la microglie (Barakat and Redzic, 2015; Inose et al., 2015; Kato and Walz, 2000; Shang et al., 2009). Le même type de réponse est décrit *in vivo* dans différents modèles d'ischémie cérébrale (voir revues : (Hanisch and Kettenmann, 2007; Taylor and Sansing, 2013; Weinstein et al., 2010)),

y compris dans le modèle MCAo qui induit une forte prolifération de la microglie dans l'hémisphère ischémié (Campanella et al., 2002).

Nos résultats préliminaires, bien que réalisés sur un faible nombre d'animaux, confirment qu'une MCAo de 60 min augmentait le nombre de cellules microgliales dans l'hémisphère lésé (figure 32A et 32B). Vingt-quatre heures après l'ischémie de 60 min, le nombre de cellules marquées positivement Iba-1, chez les souris nourries au régime standard, a été augmenté d'environ 30 % dans le cortex ischémié et de 67% dans le striatum ischémié, comparé à leurs côtés contralatéraux respectifs (figure 32A et 32B). La supplémentation en ALA réduisait le nombre de cellules marquées Iba-1^{+} de 22% et de 30%, respectivement dans le cortex et striatum lésé (figure 36B). Il est à noter que la microglie était aussi réduite dans le cortex contralatéral des souris supplémentées en ALA, comparée aux souris non supplémentées (figure 32B). Cela sous-tend un effet protecteur de l'ensemble du cerveau par la supplémentation en ALA, néanmoins, cela signifie également que dans le modèle de MCAo, l'hémisphère contralatéral n'est pas forcément le contrôle idéal, car une réponse inflammatoire pourrait s'y produire (Buga et al., 2008). Il faudrait donc réévaluer l'augmentation du nombre de cellules microgliales de nos animaux ischémiés par rapport à des animaux n'ayant pas subi d'ischémie cérébrale (animaux « sham »), dans les mêmes conditions de supplémentation.

La capacité de la supplémentation en ALA a interférer avec la réponse microgliale par la réduction de sa prolifération, nous a conduit à étudier son effet sur un autre paramètre crucial dans l'établissement des dommages, à savoir l'activation microgliale. Pour cela, j'ai étudié par cytométrie de flux avec le Dr. Agnès Petit-Paitel, l'expression des antigènes CD11c, CD86 et CD68, décrits pour être des marqueurs d'activation microgliale (cf. Chapitre I.D.4.b). L'expression de ces trois marqueurs d'activation était augmentée dans l'hémisphère ischémié (figure 32D). La supplémentation en ALA réduit l'expression de ses marqueurs d'activation dans l'hémisphère ischémié, confirmant un effet de la supplémentation en ALA sur la réponse microgliale. Et plus particulièrement CD86, qui était réduit significativement de 25% comparé à l'expression cérébrale des souris nourries au régime standard (figure 32D). CD86 est l'un des marqueurs d'activation microgliale le plus étudié lors d'une inflammation cérébrale (Remington et al., 2007). Comme précédemment, il est à noter que la supplémentation en ALA a un effet global sur le cerveau, car l'activation microgliale était aussi réduite dans une moindre mesure dans l'hémisphère contralatéral (figure 32D).

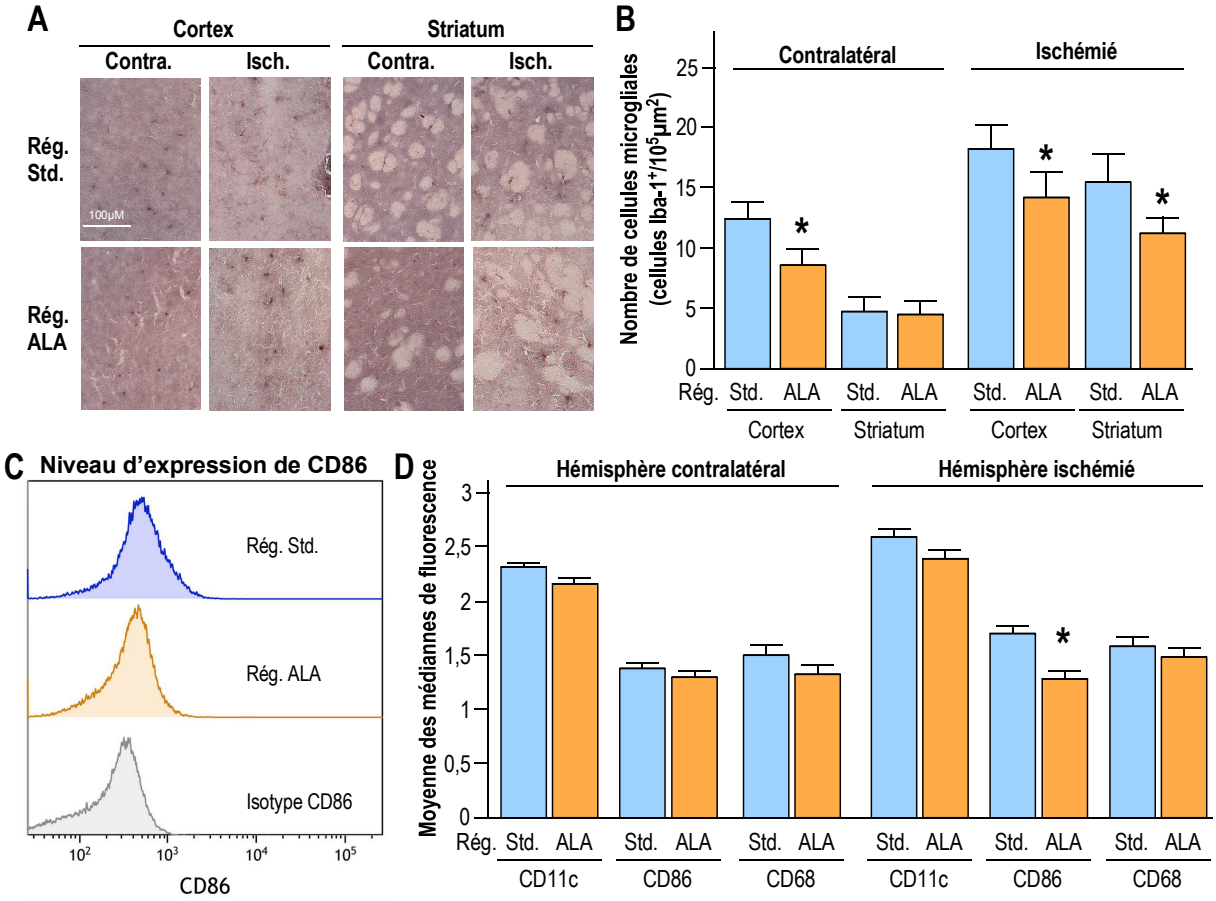


Figure 32 : Effet du régime enrichi en ALA sur la réponse microgliale 24 heures après une MCAo de 60 min.
(A) Photographie représentant un immunomarquage Iba-1 (un marqueur microglial) effectué sur des coupes de cerveaux 24h après une MCAo de 60 min. (B) Histogramme représentant la quantification des cellules Iba-1$^+$ dans le cortex et le striatum, ischémié et contralatéral. La barre d'échelle est de 100 µm, applicables à toutes les coupes. (C) Graphique représentant le niveau d'expression de CD86 dans la microglie de l'hémisphère ipsilatéral des animaux, 24h après une MCAo de 60 min, en fonction de la teneur en ALA du régime, évalué par la technique de cytométrie de flux. L'isotype CD86 permet d'obtenir le bruit de fond (contrôle négatif). (D) Histogramme représentant la fluorescence moyenne des marqueur de la microglie activée dans l'hémisphère contralatéral et ischémié, 24h après une MCAo de 60 min. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n = 6 par groupe). (*) comparé à la condition Std. *p<0,05.

Nos résultats préliminaires suggèrent donc que la supplémentation en ALA permettrait de réduire la réponse microgliale post-ischémique, réduisant la prolifération de la microglie et/ou leur activation suite à l'ischémie.

Nous avons ensuite utilisé le modèle *in vitro* pour étudier l'éventualité d'un effet direct de l'ALA sur la prolifération et l'activation de la microglie. Pour cela, nous avons étudié l'effet de 100μM d'ALA sur une la réponse à une ischémie *in vitro* par OGD sur une

lignée microgliale de souris immortalisée BV2 (Qin et al., 2013). Les BV2 sont décrites pour répondre à l'OGD, notamment en proliférant et s'activant.

Nos résultats confirment que l'OGD entrainait la prolifération des cellules microgliales BV2 (figure 33A). Le comptage cellulaire, 6 heures après l'OGD, indiquait une augmentation de 30% du nombre de cellules microgliale. Cette augmentation n'existait pas en présence de l'application de 100μM d'ALA (figure 33A).

L'OGD entraine une forte activation des cellules microgliales BV2, démontré par la surexpression de différents marqueurs d'activation (Barakat and Redzic, 2015). Pour notre étude, nous avons utilisé le test du MTT pour mesurer l'activité mitochondriale de ces cellules. L'activité mitochondriale des cellules BV2 était augmentée suite à l'OGD. Les cellules étant à confluence et sans sérum, une augmentation de l'activité mitochondriale ne pouvait être due à une augmentation de la prolifération (nombre de cellules). Aussi, la normalisation de l'activité mitochondriale par le nombre de cellules microgliales reflétait de manière indirecte l'état d'activation des cellules microgliales (figure 33B). En effet, il a été montré que l'activité mitochondriale de la microglie était impliquée dans l'activation et l'expression de médiateurs pro-inflammatoire (Park et al., 2013). Vingt-quatre heures après une OGD, l'activation de la microglie BV2 était augmentée significativement d'environ 30% (figure 33B), et le prétraitement d'ALA réduisait cette augmentation de moitié (figure 33).

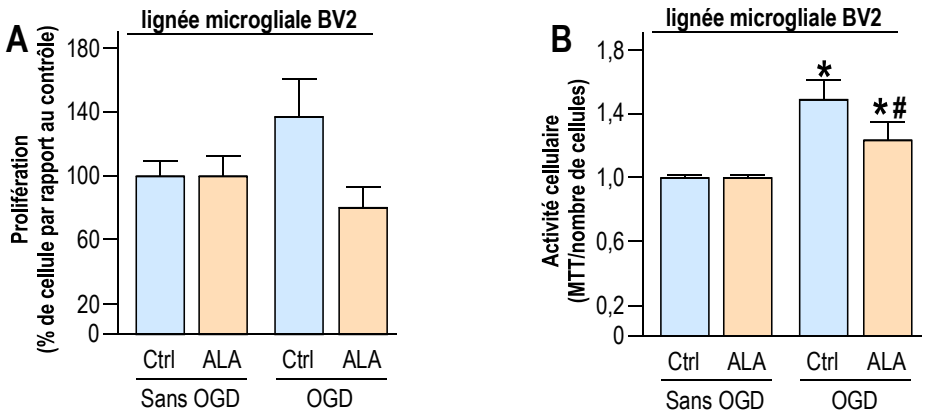


Figure 33 : Effet du prétraitement d'ALA sur la prolifération et l'activation des cellules microgliales BV2 suite à une OGD.
(A) Histogramme représentant la vitesse de prolifération par comptage cellulaire sur une culture de microglie à 20% de confluence et en présence de facteurs de croissance, 6h après une OGD de 120 min. (B) Histogramme représentant l'activité cellulaire microgliale, évaluée par le test du MTT et rapportée par le nombre de cellules comptées, sur une culture de microgle à confluence et sans facteurs de croissance, 24h après une OGD de 120 min. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM. (*) comparé à la condition sans OGD; *p<0,05. (#) comparé à la condition Ctrl OGD; #p<0,05.

Nos résultats préliminaires indiquent que l'ALA pourrait avoir une action directe sur la microglie, en réduisant leur activation et leur prolifération induits par un stress ischémique. Nous sommes actuellement en train d'étudier l'effet de l'ALA sur la sécrétion des médiateurs pro inflammatoires microgliaux suite à stress ischémique.

La microglie étant une source importante de CCL2 (Inose et al., 2015)***, la réduction de l'activation et du nombre de microglie présent dans le cerveau par la supplémentation en ALA pourrait être majoritairement impliquée dans la réduction de l'expression de cette chimiokine par l'ALA dans notre modèle d'AVC murin. Cela permet ainsi de diminuer à la fois sa neurotoxicité en condition ischémique mais aussi son pouvoir chimio-attractant responsable de l'infiltration leucocytaire et l'exacerbation de la réponse inflammatoire.***

Ces résultats nous ont donc conduit à étudier *in vivo* l'effet de la supplémentation en ALA sur l'infiltration leucocytaire, après une MCAo, qui est responsable de la sécrétion de nombreux médiateur inflammatoires, dont la chimiokine CCL2 (cf. Chapitre I.D.4.a).

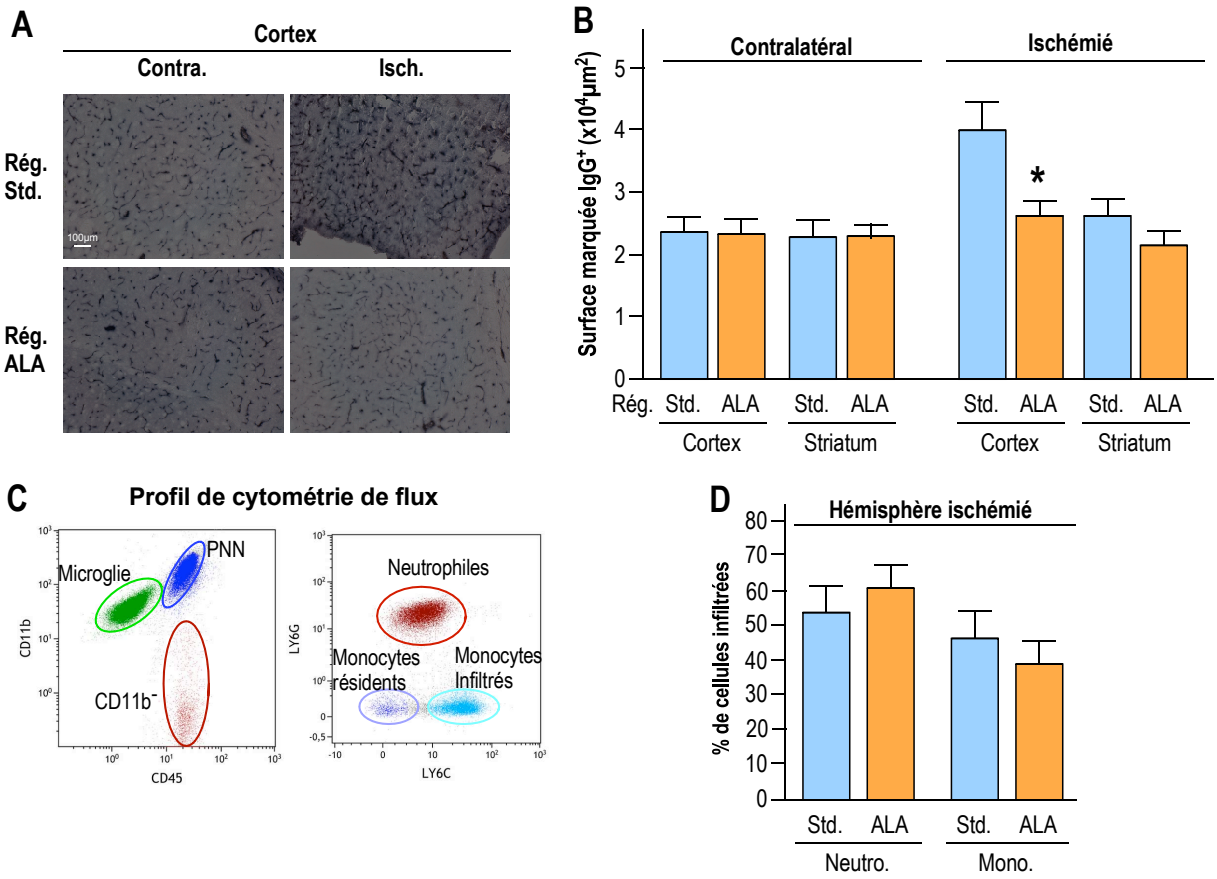


Figure 34 : Effet du régime enrichi en ALA sur l'infiltration leucocytaire, 24h après une MCAo de 60 min.
(A) Photographie représentant un immunomarquage IgG effectué sur des coupes de cerveaux 24h après une MCAo de 60 min. (B) Histogramme représentant la surface marquée IgG^+ dans le cortex et le striatum, ispilatéral et contralatéral. La barre d'échelle est de 100 µm, applicables à toutes les coupes. (C) Analyse représentative des nuages de point obtenues à partir de cellules de l'hémisphère ipsilatéral de souris ischémiées, évaluée par la technique de cytométrie de flux. Selon les différents marquages, les populations de microglies, de neutrophiles, et de monocytes résidents et infiltrés ont été différenciées. (D) Histogramme représentant la proportion de neutrophiles (neutro.) et de monocytes (mono.) infiltrés dans le parenchyme cérébral ipsilatéral, 24h après une MCAo de 60min.
Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n = 6 par groupe). (*) comparé à la condition Std. *p<0,05.

L'infiltration leucocytaire post-ischémique étant associée à une perturbation de la BHE, nous avons dans un premier temps évalué cette infiltration de manière indirecte en mesurant l'intégrité de la BHE, par l'extravasation de protéine sérique tel que l'immunoglobuline G (IgG) (Sandoval and Witt, 2008). Un marquage immunohistochimique avec un anticorps ciblant l'antigène IgG sur des coupes de cerveaux, 24h après une MCAo de 60 min montre que l'extravasation des protéines IgG était augmentée d'environ 30% dans le cortex ischémié comparé au contralatéral, chez les souris nourries au régime standard (figure 34A et 34B). Celle-ci était significativement réduite par la supplémentation en ALA. Cela traduit que le régime enrichi en ALA réduit la détérioration de la BHE et donc l'infiltration leucocytaire.

L'étape suivante a été d'étudier l'effet de la supplémentation en ALA sur la proportion des différents types cellules immunitaires, au niveau du parenchyme cérébral lésé, 24h après la MCAo. Pour cela une analyse de cytométrie de flux a été effectué, par l'étude de plusieurs marqueurs cellulaires. La figure 34C illustre les profils par cytométrie de flux avec les marqueurs CD11b et CD45, d'une part qui a permis d'isoler la microglie ($CD11b^{fort}/CD45^{faibe}$) des polynucléaire neutrophiles (PNN) et les monocytes ($CD11b^{fort}/CD45^{fort}$). La deuxième analyse par cytométrie de flux permet ensuite de différencier la microglie des PNN grâce aux marqueurs LY6C et LY6G, les neutrophiles étant $LY6G^{+}/LY6C^{moyen}$ et les monocytes infiltrés $LY6G^{-}/LY6C^{+}$. Cette caractérisation de l'infiltration leucocytaire a permis de mettre en évidence un effet de la supplémentation sur l'infiltration en réponse à une MCAo de 60 min (figure 34D). L'hémisphère ischémié des souris nourries au régime standard présente 53% de neutrophiles et 46% de monocytes, celui des souris supplémentées en ALA présente 61 % de neutrophiles et 39 % de monocytes (figure 34D). Nos résultats confirment une modification de l'infiltration leucocytaire.

Les neutrophiles sont les premières cellules sanguines présentent dans le parenchyme cérébral après un AVC (Garcia-Bonilla et al., 2014; Gelderblom et al., 2009). Leur infiltration contribue à la pathogenèse de l'AVC ischémique. En effet, les neutrophiles vont libérer des ROS, des enzymes protéolytiques et une multitude de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, dont CCL2 (Kriz, 2006; Yilmaz and Granger, 2008). L'infiltration des neutrophiles précède celle d'autres cellules inflammatoires, tels que les monocytes (Kriz, 2006). Il se pourrait donc que nos résultats traduisent un ralentissement de la réponse neuro-inflammatoire post-ischémique et donc un effet protecteur de la supplémentation en ALA, en ralentissant l'infiltration des monocytes. Pour confirmer notre hypothèse, il faudrait étudier la proportion de ces cellules 7 jours après l'occlusion, lorsque les monocytes atteignent leur pic d'expression cérébrale (Jin et al., 2010). Toutefois, nos résultats suggèrent que la réduction de l'expression neuronale et hypothétiquement microgliale de CCL2 par l'ALA entrainerait la réduction de l'infiltration des monocytes, qui sont la source principale de CCL2 dans le cerveau ischémié (Yoshimura et al., 1989a; Yoshimura et al., 1989b). Il est donc tentant d'imaginer que la réduction de l'expression de CCL2 par toutes les cellules offrirait un cercle vertueux, puisque CCL2 est nécessaire pour le recrutement des cellules inflammatoires (neutrophiles, monocytes, lymphocytes T, et cellules NK) au niveau de la lésion, après une ischémie cérébrale (Schilling et al., 2009). Ainsi, l'atténuation générale de la

neuroinflammation post-ischémique pourrait fortement participer à la réduction de l'expression de CCL2, par l'ALA, observée *in vivo*.

En conclusion, nos résultats suggèrent un lien solide entre l'ALA, la protection cérébrale et la réduction de l'expression post-AVC de CCL2. Ils démontrent un possible rôle neurotoxique de CCL2 en condition ischémique indépendant de son pouvoir chimioattractant. Nos résultats révèlent que dans son ensemble la supplémentation en ALA a un action anti-inflammatoire via la réduction de CCL2, que ce soit au niveau des neurones, de la microglie ou indirectement des leucocytes.

III. Rôle et mécanismes d'action de la chimiokine CCL2 dans la perte de poids induite par une inflammation centrale (Annexe 4)

L'**inflammation centrale** a une importance capitale dans les conséquences de l'AVC (cf. Chapitre I.D.4). Récemment, la question de son influence dans la prise de poids et dans le comportement alimentaire lors de l'établissement de l'obésité a émergé. Comme l'inflammation centrale pourrait être en lien direct avec ma thématique de recherche en influençant notamment la perte/récupération de poids après l'AVC, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'inflammation centrale, sur la perte de poids, et plus particulièrement de la chimiokine CCL2, connue pour être délétère dans l'AVC (cf. Chapitre I.D.4.d). Cette partie de mon travail de thèse s'intègre dans une collaboration entre Nicolas Blondeau et le Dr. Carole Rovère, étudiant l'effet de la neuroinflammation sur les réseaux neuronaux contrôlant la perte de poids.

Dans le cadre de notre collaboration, nous nous sommes concentrés sur l'inflammation cérébrale aigüe qui se produit lors d'un AVC ou d'infections y compris nosocomiales, et non chronique qui a été décrite dans des modèles de neurodégénérescence. Cette inflammation aigüe a été induite par l'injection de LPS. Administré en périphérie, le LPS est connu pour entrainer une inflammation périphérique et centrale, une perte d'appétit et de poids (Konsman et al., 2002). D'après la littérature récente, l'inflammation centrale induite par le LPS serait un facteur prépondérant en comparaison de l'inflammation périphérique dans l'induction de la perte de poids (Wisse et al., 2007). Aussi pour s'affranchir de ce débat entre l'importance de l'inflammation centrale et périphérique dans l'induction de la perte de poids, nous avons induit une neuroinflammation aiguë, par une injection en *i.c.v* de LPS. Celle-ci entrainait une perte de poids des animaux d'environ 11% en 24h (figure 35A). Cette perte de poids était associée à une augmentation de l'expression génique des cytokines pro-inflammatoires IL-1β, IL-6 et TNF-α dans l'hypothalamus, le centre de la régulation centrale de la prise alimentaire (figure 35B). Cette augmentation précédait la diminution de l'expression génique et protéique de 2 peptides orexigènes (favorisant la prise alimentaire), la MCH (melanin-concentrating hormone) (figure 35C et 35D) et l'Orexine (données non montrées ici ; figure EV4 de l'annexe 4). Aussi, j'ai pu contribuer au criblage par PCR quantitative en temps réel qui a mis en évidence une forte augmentation de l'expression génique des ligands des récepteurs de chimiokines CCR2, CCR1, CCR3 et CCR5, et plus particulièrement de la chimiokine CCL2

(figure 35E et 35F), entre la première vague d'activation de l'expression génique des cytokines, et avant la diminution de l'expression génique de la MCH et de l'Orexine.

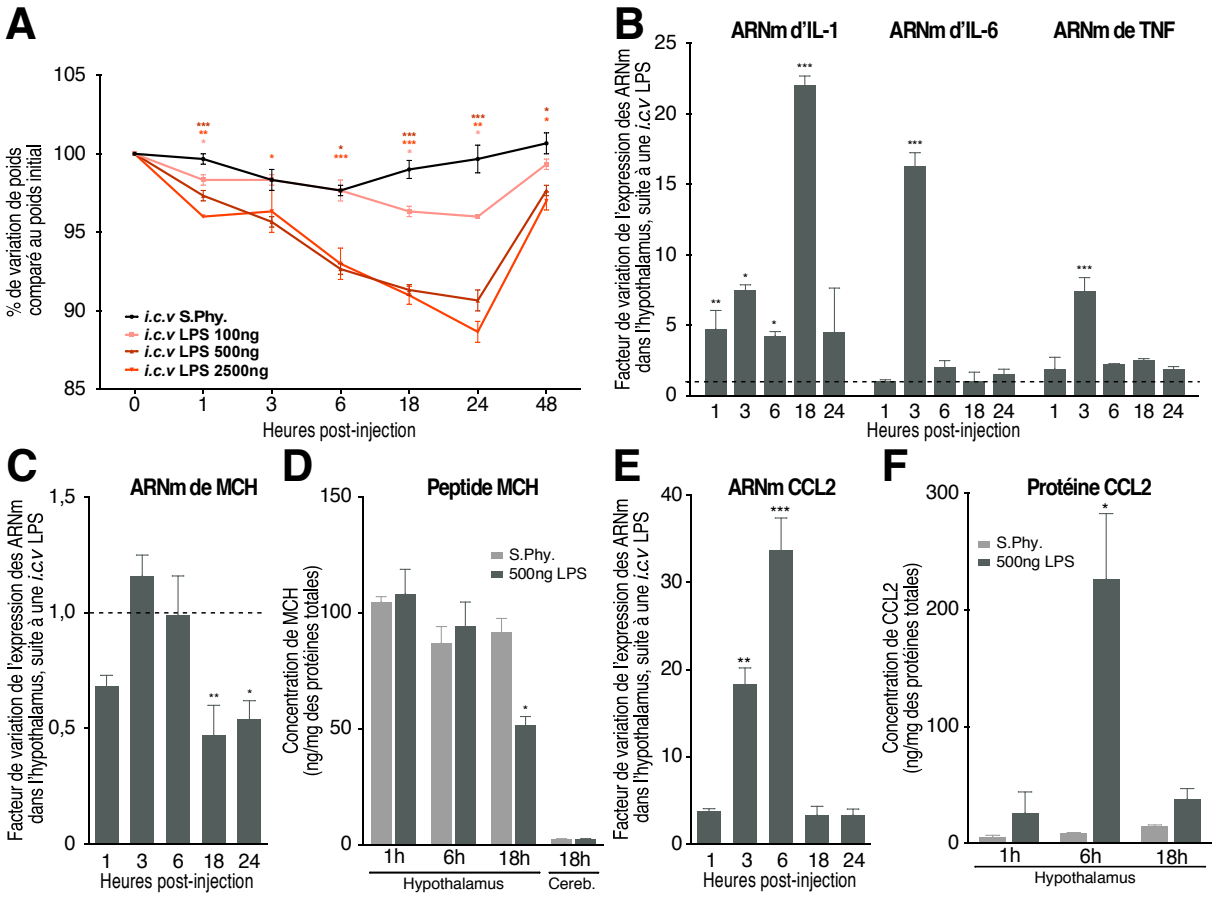


Figure 35 : Effet de l'injection *i.c.v* de LPS sur la perte de poids corporel, et l'expression de cytokines pro-inflammatoires et sur l'expression du peptide orexigénique MCH.
(A) Effets de différentes doses de LPS (*i.c.v*) sur la perte de poids corporel (n=6 à 12). (B) Expression génique des cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6 et TNF) dans l'hypothalamus des souris injectées au LPS en *i.c.v* à différents temps post-injection, normalisée avec les valeurs des souris injectées en *i.c.v* avec du S.Phy. Expression génique et protéique du peptide MCH (C et D) et de la chemiokine CCL2 (E et F) dans l'hypothalamus des souris injectées avec du LPS en *i.c.v*.
L'analyse des RT-PCR aux différents temps post-injection est réalisée en normalisant par rapport aux souris injectées au S.Phy. en *i.c.v*. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n=6 par groupe) **p*<0,05; ***p*<0,01; ****p*<0,001; injection de LPS en *i.c.v* comparée à l'injection de S.Phy. en *i.c.v*.

Cela nous a conduit à étudier l'hypothèse d'une participation prépondérante de la voie CCL2/CCR2 dans l'effet de la neuroinflammation, induite par l'injection *i.c.v* de LPS, sur la diminution de l'expression génique de la MCH et dans la perte de poids. L'inactivation pharmacologique de CCR2, chez les souris sauvages, par un antagoniste spécifique (INCB3344), ou son invalidation génique (modèle de souris déficiente pour le CCR2) supprimait les effets du LPS sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des neuropeptides orexigènes, MCH et oréxine. Ces résultats suggèrent que la signalisation CCL2/CCR2 joue un rôle capital dans la régulation négative de la MCH associée à la

neuroinflammation induite par le LPS. Pour valider cette hypothèse, nous avons réalisé des injections *i.c.v* de la protéine CCL2 (figure 36). Celle-ci reproduisait les effets du LPS. Elle induisait une inflammation cérébrale (augmentation de l'expression des cytokines/chimiokines ; figure 36A, 36B et 36C) et diminuait l'expression des neuropeptides orexigènes dans l'hypothalamus (figure 36D et 36E). Ces effets étaient abolis par la co-injection de l'antagoniste spécifique du CCR2 (INCB3344) chez des souris sauvages, et étaient aussi inexistants chez les souris CCR2$^{-/-}$ (figure 36F).

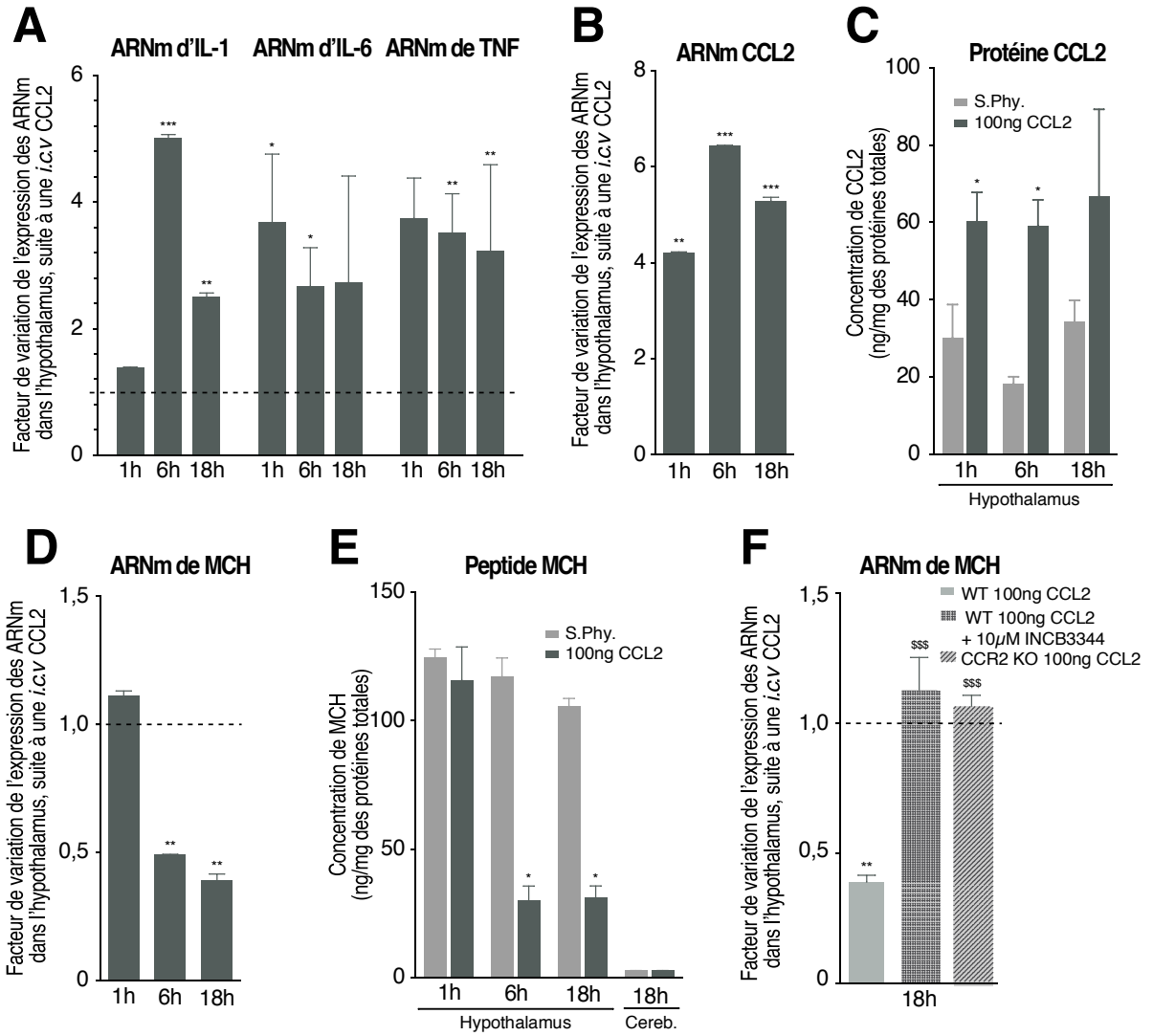


Figure 36 : Effet de l'injection *i.c.v* de CCL2 sur l'expression de cytokines pro-inflammatoires et des peptides orexigéniques dans l'hypothalamus.
(A) Expression génique des cytokines pro-inflammatoires (IL1, IL6 et TNF) dans l'hypothalamus des souris injectées avec CCL2 en *i.c.v* à différents temps post-injections. Expression protéique et génique de la chimiokine CCL2 (B et C) et du peptide MCH (D et E) dans l'hypothalamus des souris injectées avec CCL2 en *i.c.v*. L'analyse des RT-PCR aux différents temps post-injection est réalisée en normalisant avec les valeurs des souris injectées au S.Phy. en *i.c.v*. Le cérébellum a été utilisé comme contrôle négatif. Les données sont représentées par la moyenne ± SEM (n=6 par groupe) *$p < 0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ *i.c.v* CCL2 *vs i.c.v* S.Phy. (F) Effet de l'inhibition génétique et pharmacologique de CCR2 sur l'expression génique de MCH, 18h après l'injection de CCL2 en *i.c.v*.

J'ai réalisé des marquages immunohistochimiques révélant l'expression du récepteur de CCR2 sur 70% des neurones à MCH (figure 37A), le Dr. Alice Guyon a réalisé des expériences d'électrophysiologie (figure 37B et 37C) et le Dr. Ophélia Le Thuc a réalisé des expériences de sécrétion pour étudier la capacité de CCL2 à moduler directement l'activité des neurones à MCH. Les expériences de patch-clamp réalisées par le Dr Alice Guyon sur tranches de cerveaux de souris suggèrent que CCL2 pouvait diminuer l'excitabilité des neurones à MCH, et l'application de l'antagoniste spécifique du CCR2 (INCB3344) inhibait cette diminution (figure 37B et 37C). Celles réalisées par le Dr. Ophélia Le Thuc, sur des explants hypothalamiques, suggèrent que l'application de CCL2 diminuait drastiquement la libération de MCH induite par un choc dépolarisant au KCL (figure 37D). Cet effet de CCL2 sur la libération de MCH était aboli par la co-application de l'antagoniste spécifique du CCR2 (figure 37D). Ces résultats révèlent clairement des effets cellulaires et moléculaires de CCL2 sur le système peptidergique des neurones à MCH, pouvant entrainer les mêmes conséquences pathophysiologiques que le LPS. L'injection *i.c.v* de CCL2 entrainant une diminution du poids (figure 37E), cela renforce l'idée que l'expression de CCL2 et l'activation la voie CCL2/CCR2 serait un acteur majeur de la perte de poids associée à l'inflammation hypothalamique induite par le LPS.

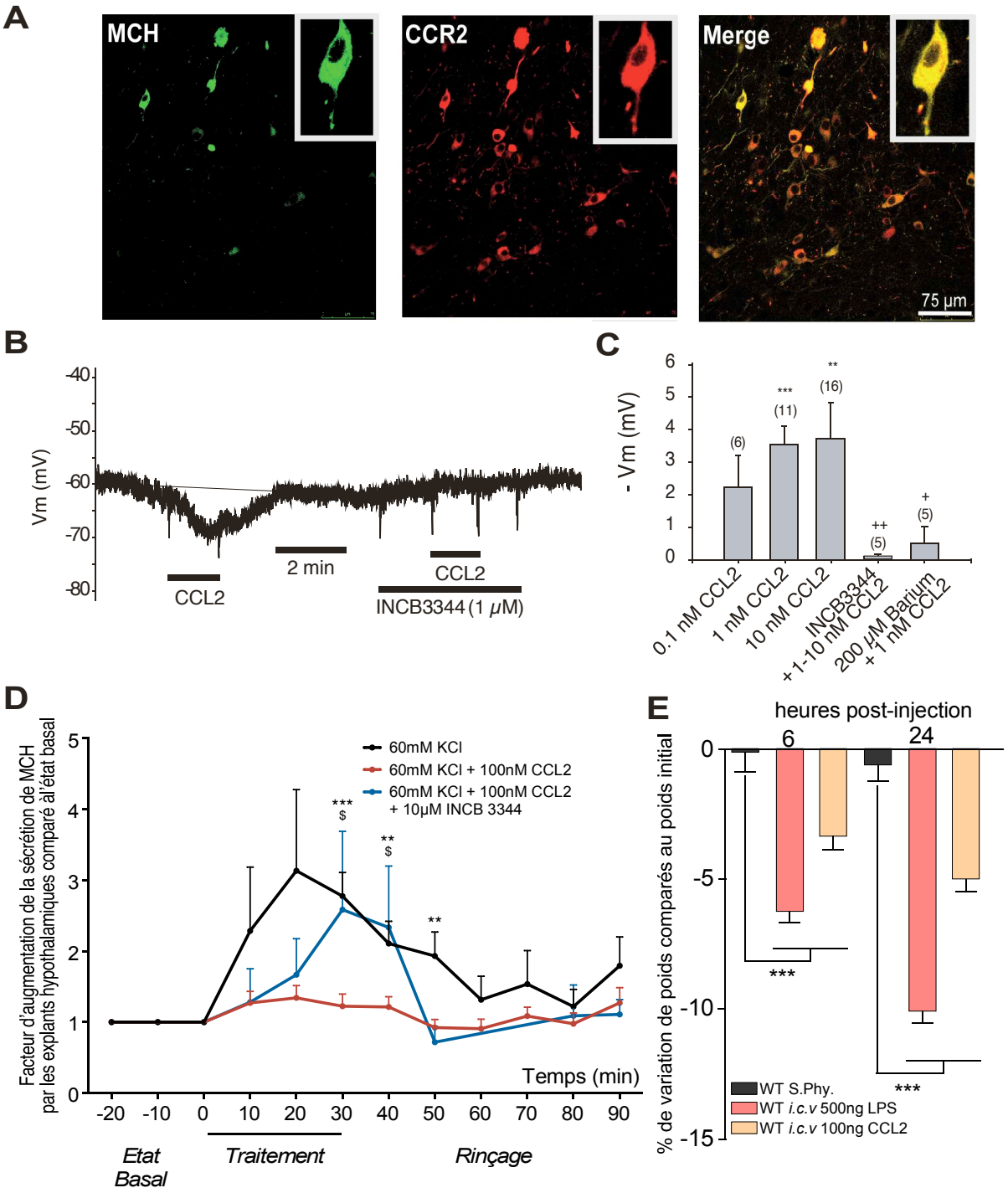


Figure 37 : Effet de la chimiokine CCL2 sur les neurones à MCH et sur la perte de poids.
(A) Colocalisation du peptide MCH et du récepteur de CCLZ (CCR2) dans l'hypothalamus latéral des souris exprimant la CFP sous le contrôle du promoteur de MCH. (B) Tracé représentant le potentiel de membrane des neurones à MCH enregistré en "current clamp". L'application de CCL2 entraine une dépolarisation qui est inhibée en présence de l'antagoniste de CCR2 (INCB3344; à 1µM). (C) Histogramme représentant l'effet de CCL2 à différentes concentrations en présence ou non d'INCB3344 (1µM) ou de barium (200µM), sur le potentiel de membrane des neurones à MCH (n=5 à 16). (D) Effet de CCL2 sur la libération de MCH par des explants hypothalamiques suite à un choc dépolarisant au KCL, en présence ou non d'INCB3344 (3 à 5 expériences indépendantes, 3 chambres par conditions dans chaque expérience). (E) Effet de l'injection *i.c.v* du S.Phy., de LPS (500ng) et de CCL2 (100ng) sur la perte de poids (n=3 à 12). Les données sont représentées par la moyenne ± SEM. *$p < 0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$, test-t après ANOVA; + $p<0,05$; ++$p<0,01$; test t apparié, comparé à leur propre contrôle.

Cette importante contribution de la voie CCL2/CCR2 à la perte de poids associée à une inflammation hypothalamique de forte intensité a été définitivement mis en évidence, en montrant que l'inactivation pharmacologique de CCR2, chez les souris sauvages, avec l'antagoniste spécifique du CCR2, ou son invalidation génique diminuait massivement la perte de poids engendrée par le LPS (eg environ 35% et 51% respectivement, 26h après l'injection de 500 ng LPS) (figure 38A et 38B).

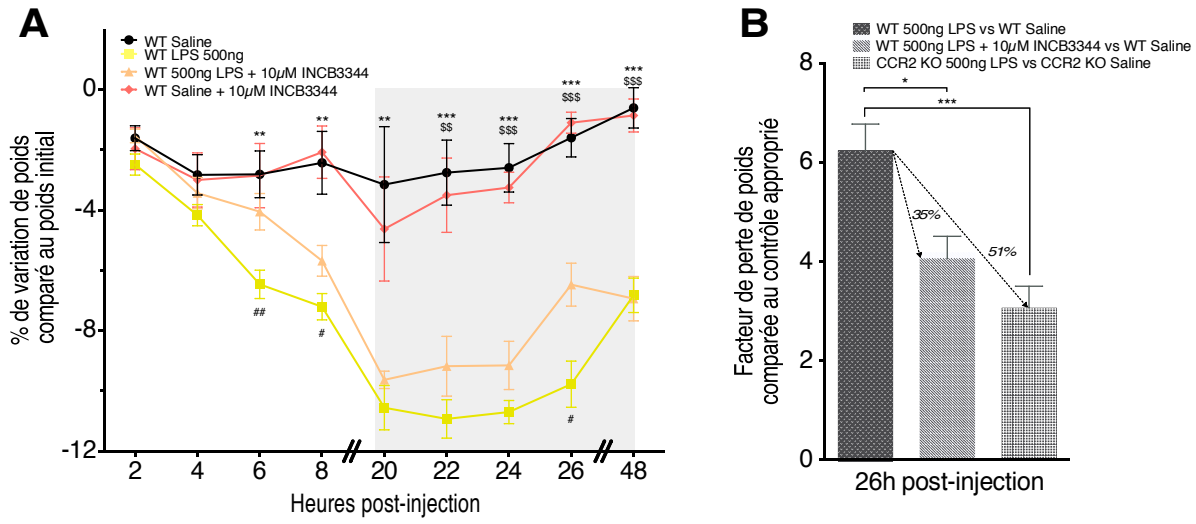


Figure 38 : Importance de la voie de signalisation CCL2 dans la perte de poids induite par le LPS.
(A) % de variation de poids comparé au poids corporel initial, à différents temps (entre 2 et 48h) après l'injection *i.c.v* de sérum physiologique, d'INCB3344, de LP, ou de LPS+INCB3344 dans les souris sauvages (n = entre 6 et 12). (B) Facteur de perte de poids comparé au contrôle injecté au sérum physiologique, 26 heures après l'injection i.c.v de LPS ou de LPS+INCB3344 dans les souris sauvages, ou de LPS dans les souris CCR2 KO (n=6). Les données sont représentées par la moyenne ± SEM. *, $, # $p < 0,05$; **, $$,## $p<0,01$; ***, $$$, ### $p<0,001$. * compare l'injection de sérum physiologique et de LPS; $ compare l'injection de sérum physiologique et de LPS+INCB3344; et # compare l'injection de LPS et de LPS+INCB3344.

Pour conclure, notre collaboration avec le Dr. Rovère a permis d'identifier la voie CCL2/CCR2 comme acteur crucial de la perte de poids associée à une neuroinflammation induite par le LPS. Mes travaux sur la récupération fonctionnelle post-AVC ayant attiré l'attention sur l'importance de la gestion de la perte de poids dans la récupération fonctionnelle post-AVC, le système CCL2/CCR2 pourrait être un candidat intéressant à étudier en lien entre la supplémentation en ALA, la perte de poids, la récupération fonctionnelle et la neuroinflammation.

Conclusion et Perspectives

Peu de neuropathologies sont aussi complexes et dévastatrices que l'AVC, une des principales causes de mortalité et d'handicaps dans le monde. Les études précliniques ont identifié plus de 1000 molécules ayant des propriétés neuroprotectrices dans différents modèles expérimentaux d'AVC ischémique. Cela a engendré de grandes attentes au niveau clinique et plus de 500 publications traitent d'études cliniques sur l'AVC. Or à ce jour la quasi-intégralité des essais cliniques ont échoué engendrant un désert thérapeutique face à l'AVC. Devant l'absence de médication, les stratégies mises en place se veulent le plus intégrative possible : prévention des facteurs de risque, prise en charge hospitalière optimisée à l'admission aux urgences et suivi en service de réadaptation. La vision de la prise en charge de l'AVC se doit et devient « globale ».

C'est dans ce contexte que l'idée d'une intervention nutritionnelle a émergé, notamment avec les AGPIs ω-3. Mon laboratoire d'accueil s'est focalisé sur le précurseur des AGPIs ω-3 d'origine végétal, l'acide α-linolénique. Leurs travaux ont démontré que la supplémentation nutritionnelle en ALA, par voie orale et *i.v*, permet de réduire les dommages ischémiques en ayant un effet neuroprotecteur direct (*via* le canal potassique TREK-1) et en favorisant la vasodilatation des artères cérébrales et la neuroplasticité. Pour autant, l'AVC étant la première cause d'handicap acquis dans le monde, la réduction des séquelles motrices et cognitives est le critère qui revêt à l'heure actuelle le plus d'importance pour le clinicien, comme pour le patient. Trop longtemps oublié de la recherche préclinique, étudier l'effet d'un traitement potentiel sur la récupération fonctionnelle s'impose actuellement comme le paramètre crucial pour la translation clinique d'un traitement contre l'AVC. Et c'est cette approche proposée par le laboratoire qui a motivé mon doctorat, puisqu'elle pourrait un jour avoir un impact sociétal. Par conséquent, le premier aspect de mon doctorat dans lequel je me suis intégralement investi a été d'étudier le potentiel de la supplémentation nutritionnelle en ALA sur la récupération fonctionnelle post-AVC.

Mes premiers travaux visaient à évaluer l'effet de l'ALA, tout en comparant la supplémentation par voie orale et par voie *i.v*, sur la récupération fonctionnelle suite à une MCAo de 30 min, un modèle d'ischémie murin permettant l'étude des déficits moteurs et cognitifs à long-terme. Alors que les deux types de supplémentation en ALA ont permis d'améliorer l'apprentissage et la mémoire spatiale après un AVC, seule la supplémentation orale a permis une amélioration de la fonction motrice, dans nos conditions expérimentales. Si

la réduction des dommages neuronaux hippocampiques est corrélée à l'amélioration de la fonction cognitive, aucune différence neuroanatomique dans la région caudate-putamen n'a été observée et qui aurait pu expliquer l'amélioration de la récupération motrice par la supplémentation orale. En revanche, alors que la perte de poids induite par la MCAo était similaire dans tous les groupes, au premier jour après l'ischémie, la reprise de poids est accélérée uniquement par la supplémentation orale en ALA, dans la première semaine post-ischémique coïncidant avec l'amélioration de la récupération motrice.

Ainsi le premier axe traitant de la supplémentation nutritionnelle et de l'AVC, a permis d'identifier la perturbation de la régulation du poids corporel comme importante sur la récupération motrice. Cela soulève une hypothèse qui prend racine dans un autre champ thématique que les précédents (nutrition et AVC) qui relève de la neuroendocrinologie.

En effet, la compréhension de la régulation neuroendocrine du poids pourrait complémenter nos observations du premier axe. Nous nous sommes alors focalisés sur les mécanismes impliqués dans la perte de poids induite par une neuroinflammation aigue, celle-ci se déroulant à la fois lors d'une infection et d'un AVC. En collaboration avec le Dr. Rovère, nous avons montré que l'injection centrale de LPS, connue pour entrainer une neuroinflammation et une perte de poids, conduit à des modifications spécifiques au niveau des neurones hypothalamiques. En effet, l'injection *i.c.v* de LPS entraine une augmentation précoce de l'expression de la chimiokine CCL2, qui précède une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et une diminution du neuropeptide oréxigène MCH. Nous avons démontré que l'injection *i.c.v* de CCL2 induit également une neuroinflammation et une diminution de l'expression de MCH, et finalement une perte de poids, similaires à celles obtenues par le LPS. De plus, l'inhibition pharmacologique ou génétique de la voie de signalisation de CCL2/CCR2 altère les effets du LPS, au niveaux moléculaires et physiologiques. Ainsi, ces travaux nous suggèrent que la voie de signalisation de CCL2 joue un rôle crucial dans la perte de poids induite par une neuroinflammation aigüe.

Ainsi le deuxième axe qui traite de la régulation du poids et de la neuroinflammation, a permis d'identifier la perturbation du système CCL2 comme importante sur la régulation du poids corporel. Cela soulève l'hypothèse de son importance

et plus généralement dans les thématiques originales du premier axe que sont la nutrition et AVC.

Dans l'AVC, cette chimiokine CCL2 est fortement exprimée au niveau cérébral et est potentiellement impliquée dans les dommages ischémiques en favorisation l'infiltration leucocytaire. C'est pourquoi durant la dernière partie de ma thèse, nous sommes concentrés à savoir si un des mécanismes protecteurs de l'ALA contre l'AVC, pouvait cibler la réduction de la surexpression de CCL2 après un accident ischémique.

Parmi la centaine de gènes décrits pour être impliqués dans l'inflammation post-ischémique, nous avons identifié la surexpression de CCL2, dans le cortex ischémié, comme étant la plus importante. De plus, sa surexpression en condition ischémique fut drastiquement réduite *in vivo* et *in vitro*, respectivement par la supplémentation en ALA et par l'application de l'ALA. Nous avons ensuite démontré que la réduction de la surexpression de CCL2 par l'ALA pourrait réduire directement la neurotoxicité *in vitro*, et qu'*in vivo* la réduction de son expression par l'ALA est associée à la réduction de l'infiltration leucocytaire et l'altération de la BHE. La supplémentation nutritionnelle en ALA pourrait être un traitement contre l'AVC ischémique en agissant sur la réponse inflammatoire post-ischémique, et plus particulièrement sur la surexpression délétère de la chimiokine CCL2.

Ainsi le troisième et dernier axe finalise l'hypothèse d'un lien entre la neuroinflammation avec la chimiokine CCL2, la nutrition et l'AVC.

Pour résumé pris indépendamment, le premier axe sur la supplémentation nutritionnelle et l'AVC a permis **d'identifier le poids** comme étant un paramètre crucial pour la récupération fonctionnelle. L'étude de la relation entre le poids corporel et la neuroinflammation dans le deuxième axe a permis **d'identifier la chimiokine CCL2** comme étant une cible majeure dans la régulation de la perte de poids suite à une inflammation centrale et périphérique. Et enfin le dernier axe apporte la **confirmation du rôle délétère de l'expression de CCL2 post-ischémique**, et celle-ci peut être réduite par la supplémentation nutritionnelle en ALA dans le cadre de l'AVC.

Pris dans leur ensemble, les trois axes offrent des pistes de réflexion sur le premier axe. La supplémentation nutritionnelle en ALA, en réduisant l'expression de CCL2, pourrait

bloquer les effets décrits dans le deuxième axe, participant aussi à l'amélioration de la récupération fonctionnelle post-ischémique. En effet, il serait intéressant dans un premier temps d'étudier l'effet de la supplémentation orale et *i.v* en ALA sur l'expression de CCL2, dans la première semaine post-ischémique. Si seule la supplémentation orale en ALA permettait la diminution de l'expression de CCL2, cela permettrait de révéler l'importance de CCL2 également dans la récupération motrice post-AVC. En s'appuyant sur les résultats obtenus dans le deuxième axe, nous pourrions étudier s'il existe une augmentation de l'expression des neuropeptides orexinérgiques (MCH et Orexine), uniquement dans l'hypothalamus des animaux supplémentés oralement en ALA, dans la première semaine après une MCAo de 30 min. Quelques soit les résultats de ces hypothèses, ils nous permettraient de répondre au moins partiellement à l'interrogation soulevée dans le premier axe à savoir l'existence d'une différence mécanistique selon le type de la supplémentation en ALA employée (oral *vs. i.v*).

En conclusion, ces résultats suggèreraient qu'une prise en charge par la supplémentation nutritionnelle lipidique favoriserait la récupération fonctionnelle post-AVC. En expliquant le mécanisme du regain de poids, cela apporterait une nouveauté qui viendrait enrichir les résultats de la prise en charge nutritionnelle par les glucides et les protéines dont les résultats bénéfiques sur la récupération fonctionnelle sont principalement dus à l'apport énergétique.

De plus, les liens découverts entre l'AVC, l'ALA, la nutrition, l'inflammation et le poids, ouvrent de nouvelles **perspectives** de recherche, notamment l'étude de l'**obésité dans le cadre de l'AVC**. (cf. Chapitre II.C.b). L'obésité est caractérisée par une prise de poids excessive, le plus souvent liée à un régime hypercalorique et une inflammation chronique. L'obésité sévère et morbide sont décrites comme étant délétères dans le pronostic vital des patients victimes d'AVC, contrairement aux patients présentant une légère obésité (cf. « paradoxe de l'obésité »). L'excès calorique conduisant à l'obésité nutritionnelle vient majoritairement d'un excès lipidique. Les régimes occidentaux hyperlipidiques sont surtout constitués d'acides gras saturés, mais contiennent peu d'AGPIs de type ω-3. De plus, il semblerait que l'obésité soit délétère dans le cadre de l'AVC, puisque des études expérimentales montrent une aggravation des dommages ischémiques chez les animaux obèses (Maysami et al., 2015; Terao et al., 2008). Ainsi l'obésité et la carence en ALA

semblent augmenter les dommages post-ischémiques. Il serait donc intéressant de savoir si cela est corrélé à une surexpression de la chimiokine CCL2 au niveau cérébral, et si cette surexpression se produit avant et/ou après l'ischémie cérébrale. L'étape suivante serait d'étudier une potentielle réversion des effets négatifs de l'obésité sur l'AVC par la supplémentation en ALA. Enfin, de manière plus générale, une idée a été soulevée à partir de notre collaboration sur la neuroendocrinologie développée dans le deuxième axe du doctorat. En effet, cette supplémentation nutritionnelle en ALA pourrait s'avérer bénéfique dans le cadre de l'obésité, en réduisant l'effet de la chimiokine CCL2 sur les neurones responsables du contrôle de la prise alimentaire, ce qui permettrait d'apporter une résistance à l'obésité.

D'autre part, nous avons toujours soutenu l'hypothèse que les effets de l'ALA ne sont pas du a sa conversion en des dérivés à longue chaine, notamment le DHA, dont les effets pourraient être associés à ses métabolites oxygénés, comme la neuroprotectine D1.

En effet, les effets que nous observons seraient uniquement dus à l'ALA, puisque les deux types de supplémentation ne modifient pas la concentration cérébrale en DHA (figure 27A), ni la quantité d'acides gras saturé, mono- et polyinsaturés (figure 27C).

Pour autant, de nouveaux dérivés lipidiques oxydés issus de la peroxydation non-enzymatique de l'ALA ont été découverts très récemment, ce sont les phytoprostanes (PhytoPs). Cette voie d'oxydation non-enzymatique des AGs est induite par les espèces radicalaires, et a lieu dans toutes les cellules, engendrant 32 PhytoPs possibles.

Ces PhytoPs sont retrouvés dans les végétaux, leur abondance dépend des teneurs en ALA et au niveau d'exposition au stress oxydant. Ils ont également été retrouvé dans l'alimentation humaine, notamment dans les huiles végétales de lin ou encore de colza (Karg et al., 2007). Chez l'homme, une consommation chronique (4 semaines) d'huile de lin, contenant 25,6mg/L de PhytoPs, entraine une augmentation de leur concentration plasmatique (Barden et al., 2009). Cette étude montre également que ces PhytoPs, retrouvés dans le plasma, sont non seulement issus de leur absorption *via* l'huile végétale, mais aussi de la peroxydation *in vivo* de l'ALA apporté par cette huile. L'exposition de l'homme aux PhytoPs dépend donc de son niveau de consommation de PhytoPs mais également de l'ALA. Dans notre modèle animal, la supplémentation en ALA pourrait donc augmenter l'exposition aux PhytoPs.

Ces dérivé oxydé de l'ALA semblent comme les dérivés du DHA bioactifs puisque les études sur différents modèles végétaux montrent que les PhytoPs ont un effet antioxydant

(Loeffler et al., 2005) et inhibent la croissance et la division cellulaire (Mueller et al., 2008). De plus, si très peu d'études ont été effectuées dans les modèles animaux ou encore chez l'homme, certains PhytoPs qui sont structurellement proches des prostaglandines semblent présenter un rôle inflammatoire (Gutermuth et al., 2007; Mariani et al., 2007). Ces PhytoPs seraient capables de réduire la production d'IL-12 par les cellules dendritiques humaines, favorisant ainsi une réponse immunitaire de type Th2. D'autres études ont montré que ces dérivés oxydés de l'ALA ont des propriétés anti-inflammatoires en inhibant le facteur de transcription NFKB. Très récemment, une étude a révélé un effet neuroprotecteur de certains PhytoPs sur des cellules nerveuses immatures dans un modèle de stress oxydatif (Minghetti et al., 2014).

Ces dérivés oxydés de l'ALA possèdent donc des propriétés très intéressantes dans le cadre de l'AVC. De plus, l'épisode ischémique engendre des espèces radicalaires et donc pourrait favoriser la génération de ces dérivés de l'ALA. L'étude de ces PhytoPs dans nos modèles expérimentaux d'AVC, serait l'ultime étape pour identifier un éventuel médiateur de l'ALA.

Pour conclure ces 4 ans de doctorat, mes travaux soulignent la nécessité, au niveau préclinique, de prendre en compte dans l'étude d'un traitement contre l'AVC, des facteurs de risque tel que l'obésité. En effet, cela aurait pour but de de reproduire ce qui se passe réellement au niveau clinique, parce que les patients victimes d'AVC présentent généralement plusieurs facteurs de risque et de comorbidité. Ces différents facteurs de risque peuvent être reproduits dans nos modèles animaux, que ce soit l'obésité, le diabète, ou encore l'âge. Pour ce qui est des facteurs de comorbidité, telles que les infections nosocomiales, l'inflammation induite par le LPS peut être utilisée. Il présente un intérêt majeur à les utiliser car, si travailler sur des animaux sains permet d'apporter la preuve du concept qu'un traitement pourrait être bénéfique contre l'AVC, plus de 1000 candidats ont été ainsi découverts et aucun n'a permis la genèse d'un médicament. C'est pourquoi, il faudrait réitérer ces études sur des animaux présentant différents facteurs de risque, modifiables ou non. C'est d'ailleurs l'une des recommandations du conseil scientifique STAIR qui vise à améliorer la recherche de traitement contre l'AVC (cf. Chapitre II.B). Le programme de recherche de mon laboratoire d'accueil s'inscrit dans cette démarche scientifique proposée par le STAIR. En effet, l'ensemble des travaux sur l'ALA du laboratoire ont intégré l'intégralité de l'unité neurovasculaire, les différents mécanismes moléculaires et cellulaires (de l'excitotoxicité à la

neuroinflammation, etc) lié à la mort neuronale pour prendre en compte l'aspect multifactoriel de la pathologie.

Réintégrer cela dans la nutrition *via* la supplémentation nutritionnelle par l'ALA, a conduit mon laboratoire à sortir du carcan de l'étude d'une molécule unique capable d'agir sur un mécanisme défini entrainant une protection. En effet, l'ALA *via* la nutrition induit une multitude d'effets moléculaires et cellulaires bénéfiques, mais ces effets pris séparément ne peuvent à eux seuls expliquer la réduction de l'ensemble des dommages ischémiques. Cela ressemble, en quelque sorte, à une approche plus holistique, à laquelle j'ai adhéré durant mon doctorat. Evidemment, c'est un concept qui est encore mal accepté dans le monde de la recherche scientifique, où tout bénéfice physiologique doit être corrélé à une mécanistique précise.

L'originalité de nos travaux est d'apporter des preuves expérimentales à un concept simple et trop peu étudié : l'importance des nutriments dans la résistance aux pathologies. Nos travaux montrent qu'une simple modification de l'alimentation peut avoir un impact considérable sur les conséquences d'une pathologie aussi dévastatrice que l'AVC. J'ai été surpris de voir l'intérêt suscité par nos travaux lors des différents congrès auxquels j'ai participé. Ce qui sous-tend que les mentalité sont en train d'évoluer et que si contrairement à une molécule synthétique, l'ALA n'intéresse pas l'industrie pharmaceutique, il n'est donc pas utopique de penser qu'un jour l'ALA, ou autre nutriment dérivé des ω-3, puisse faire l'objet d'un essai clinique dans le cadre de l'AVC en tant que « soutien nutritionnel ».

Nous espérons qu'un jour, nos travaux soient pris en considération par les allégations sanitaires telles que l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), pour faire évoluer la consommation d'AGPIs ω-3, et notamment l'ALA, par la société de manière générale, à l'image de ce qui a été fait avec la consommation du sel. Les travaux scientifiques, montrant le rôle néfaste d'une surconsommation de sel sur la santé, ont conduit à une réduction de la consommation du sel par la population. Cette réduction a été obtenue grâce aux actions des organismes de santé, d'une part en sensibilisant la population sur le danger du sel, et d'autre part en obligeant l'industrie agroalimentaire de réduire la teneur en sel de ces produits alimentaires. Une action similaire en faveur des AGPIs ω-3 sera sans doute profitable pour la santé de nos concitoyens et nos travaux apportent la première pierre à cet ambitieux édifice.

Références Bibliographiques

(STAIR), S.T.A.I.R. (1999). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. In Stroke, pp. 2752-2758.
Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. Neurobiol Dis *37*, 13-25.
Abbruscato, T.J., and Davis, T.P. (1999). Combination of hypoxia/aglycemia compromises in vitro blood-brain barrier integrity. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics *289*, 668-675.
Abdel-Halim, M.S., Hamberg, M., Sjoquist, B., and Anggard, E. (1977). Identification of prostaglandin D2 as a major prostaglandin in homogenates of rat brain. Prostaglandins *14*, 633-643.
Abramova, N., Charniga, C., Goderie, S.K., and Temple, S. (2005). Stage-specific changes in gene expression in acutely isolated mouse CNS progenitor cells. Dev Biol *283*, 269-281.
Abumiya, T., Lucero, J., Heo, J.H., Tagaya, M., Koziol, J.A., Copeland, B.R., and del Zoppo, G.J. (1999). Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin alpha(v)beta3 during focal cerebral ischemia. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *19*, 1038-1050.
Ada, L., Dean, C.M., Morris, M.E., Simpson, J.M., and Katrak, P. (2010). Randomized trial of treadmill walking with body weight support to establish walking in subacute stroke: the MOBILISE trial. Stroke *41*, 1237-1242.
Adams, J.M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science *281*, 1322-1326.
Adeyemo, B.O., Simis, M., Macea, D.D., and Fregni, F. (2012). Systematic review of parameters of stimulation, clinical trial design characteristics, and motor outcomes in non-invasive brain stimulation in stroke. Front Psychiatry *3*, 88.
Adibhatla, R.M., and Hatcher, J.F. (2008). Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies. BMB Rep *41*, 560-567.
Ahmad, M., and Graham, S.H. (2010). Inflammation after stroke: mechanisms and therapeutic approaches. Translational stroke research *1*, 74-84.
Akins, P.T., Feldman, H.A., Zoble, R.G., Newman, D., Spitzer, S.G., Diener, H.C., and Albers, G.W. (2007). Secondary stroke prevention with ximelagatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation: pooled analysis of SPORTIF III and V clinical trials. Stroke *38*, 874-880.
Allan, S.M., Tyrrell, P.J., and Rothwell, N.J. (2005). Interleukin-1 and neuronal injury. Nat Rev Immunol *5*, 629-640.
Allen, C.L., and Bayraktutan, U. (2008). Risk factors for ischaemic stroke. In Int J Stroke (Blackwell Publishing Ltd), pp. 105-116.
Allen, C.L., and Bayraktutan, U. (2009). Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. Int J Stroke *4*, 461-470.
Amantea, D., Nappi, G., Bernardi, G., Bagetta, G., and Corasaniti, M.T. (2009). Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. FEBS J *276*, 13-26.
Amarenco, P., Labreuche, J., Lavallee, P., and Touboul, P.J. (2004). Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis. Stroke *35*, 2902-2909.

Andersen, K.K., Olsen, T.S., Dehlendorff, C., and Kammersgaard, L.P. (2009). Hemorrhagic and ischemic strokes compared: stroke severity, mortality, and risk factors. Stroke *40*, 2068-2072.
Anderson, C.M., and Swanson, R.A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. Glia *32*, 1-14.
Antithrombotic Trialists, C. (2002). Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. Bmj *324*, 71-86.
Appel, L.J., Brands, M.W., Daniels, S.R., Karanja, N., Elmer, P.J., Sacks, F.M., and American Heart, A. (2006). Dietary approaches to prevent and treat hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. Hypertension *47*, 296-308.
Appel, L.J., Moore, T.J., Obarzanek, E., Vollmer, W.M., Svetkey, L.P., Sacks, F.M., Bray, G.A., Vogt, T.M., Cutler, J.A., Windhauser, M.M., *et al*. (1997). A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. N Engl J Med *336*, 1117-1124.
Aquilani, R., Scocchi, M., Iadarola, P., Franciscone, P., Verri, M., Boschi, F., Pasini, E., and Viglio, S. (2008). Protein supplementation may enhance the spontaneous recovery of neurological alterations in patients with ischaemic stroke. In Clinical Rehabilitation (SAGE Publications), pp. 1042-1050.
Aquilani, R., Sessarego, P., Iadarola, P., Barbieri, A., and Boschi, F. (2011). Nutrition for brain recovery after ischemic stroke: an added value to rehabilitation. Nutr Clin Pract *26*, 339-345.
Aronowski, J., Ostrow, P., Samways, E., Strong, R., Zivin, J.A., and Grotta, J.C. (1994). Graded bioassay for demonstration of brain rescue from experimental acute ischemia in rats. Stroke *25*, 2235-2240.
Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. Nature medicine *8*, 963-970.
Asahi, M., Asahi, K., Jung, J.C., del Zoppo, G.J., Fini, M.E., and Lo, E.H. (2000). Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *20*, 1681-1689.
Asahi, M., Wang, X., Mori, T., Sumii, T., Jung, J.C., Moskowitz, M.A., Fini, M.E., and Lo, E.H. (2001). Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *21*, 7724-7732.
Ascherio, A., Rimm, E.B., Hernan, M.A., Giovannucci, E.L., Kawachi, I., Stampfer, M.J., and Willett, W.C. (1998). Intake of potassium, magnesium, calcium, and fiber and risk of stroke among US men. Circulation *98*, 1198-1204.
Asplund, K., Karvanen, J., Giampaoli, S., Jousilahti, P., Niemela, M., Broda, G., Cesana, G., Dallongeville, J., Ducimetriere, P., Evans, A., *et al*. (2009). Relative risks for stroke by age, sex, and population based on follow-up of 18 European populations in the MORGAM Project. Stroke *40*, 2319-2326.
Astrup, J., Siesjo, B.K., and Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. Stroke *12*, 723-725.
Astrup, J., Symon, L., Branston, N.M., and Lassen, N.A. (1977). Cortical evoked potential and extracellular K+ and H+ at critical levels of brain ischemia. Stroke *8*, 51-57.
Ayala, C., Croft, J.B., Greenlund, K.J., Keenan, N.L., Donehoo, R.S., Malarcher, A.M., and Mensah, G.A. (2002). Sex differences in US mortality rates for stroke and stroke subtypes by race/ethnicity and age, 1995-1998. Stroke *33*, 1197-1201.

Azouvi, P., Bartolomeo, P., Beis, J.M., Perennou, D., Pradat-Diehl, P., and Rousseaux, M. (2006). A battery of tests for the quantitative assessment of unilateral neglect. Restor Neurol Neurosci *24*, 273-285.
Bacigaluppi, M., Comi, G., and Hermann, D.M. (2010). Animal models of ischemic stroke. Part two: modeling cerebral ischemia. Open Neurol J *4*, 34-38.
Bagga, D., Wang, L., Farias-Eisner, R., Glaspy, J.A., and Reddy, S.T. (2003). Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *100*, 1751-1756.
Balkaya, M., Kröber, J., Gertz, K., Peruzzaro, S., and Endres, M. (2013a). Characterization of long-term functional outcome in a murine model of mild brain ischemia. In J Neurosci Methods, pp. 179-187.
Balkaya, M., Krober, J.M., Rex, A., and Endres, M. (2013b). Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *33*, 330-338.
Bandopadhyay, R., Orte, C., Lawrenson, J.G., Reid, A.R., De Silva, S., and Allt, G. (2001). Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. J Neurocytol *30*, 35-44.
Banerjee, C., Moon, Y.P., Paik, M.C., Rundek, T., Mora-McLaughlin, C., Vieira, J.R., Sacco, R.L., and Elkind, M.S. (2012). Duration of diabetes and risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. Stroke *43*, 1212-1217.
Bang, H.O., Dyerberg, J., and Nielsen, A.B. (1971). Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. Lancet *1*, 1143-1145.
Barakat, R., and Redzic, Z. (2015). Differential cytokine expression by brain microglia/macrophages in primary culture after oxygen glucose deprivation and their protective effects on astrocytes during anoxia. Fluids Barriers CNS *12*, 6.
Barbagallo Sangiorgi, G., Barbagallo, M., Giordano, M., Meli, M., and Panzarasa, R. (1994). alpha-Glycerophosphocholine in the mental recovery of cerebral ischemic attacks. An Italian multicenter clinical trial. Ann N Y Acad Sci *717*, 253-269.
Barden, A.E., Croft, K.D., Durand, T., Guy, A., Mueller, M.J., and Mori, T.A. (2009). Flaxseed oil supplementation increases plasma F1-phytoprostanes in healthy men. The Journal of nutrition *139*, 1890-1895.
Baron, J.C. (1999). Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment. Cerebrovascular diseases *9*, 193-201.
Baron, J.C., von Kummer, R., and del Zoppo, G.J. (1995). Treatment of acute ischemic stroke. Challenging the concept of a rigid and universal time window. Stroke *26*, 2219-2221.
Barone, F.C., and Feuerstein, G.Z. (1999). Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *19*, 819-834.
Bazan, N.G., Eady, T.N., Khoutorova, L., Atkins, K.D., Hong, S., Lu, Y., Zhang, C., Jun, B., Obenaus, A., Fredman, G., *et al*. (2012). Novel aspirin-triggered neuroprotectin D1 attenuates cerebral ischemic injury after experimental stroke. Experimental neurology *236*, 122-130.
Bazinet, R.P., and Laye, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. Nature reviews Neuroscience *15*, 771-785.
Bejot, Y., Giroud, M., Rouaud, O., Benatru, I., Moreau, T., Freycz, M., Osseby, G.V., and Neurologues Hospitaliers et Liberaux de, D. (2007a). [Trends in stroke incidence and case-fatality rates over a 20-year period (1985-2004) in Dijon, France]. Bull Acad Natl Med *191*, 305-322; discussion 322-304.
Bejot, Y., Rouaud, O., Durier, J., Caillier, M., Marie, C., Freysz, M., Yeguiayan, J.M., Chantegret, A., Osseby, G., Moreau, T., *et al*. (2007b). Decrease in the stroke case fatality

rates in a French population-based twenty-year study. A comparison between men and women. Cerebrovascular diseases *24*, 439-444.
Belayev, L., Busto, R., Zhao, W., and Ginsberg, M.D. (1996). Quantitative evaluation of blood-brain barrier permeability following middle cerebral artery occlusion in rats. In Brain Res, pp. 88-96.
Belayev, L., Khoutorova, L., Atkins, K.D., and Bazan, N.G. (2009). Robust docosahexaenoic acid-mediated neuroprotection in a rat model of transient, focal cerebral ischemia. Stroke *40*, 3121-3126.
Belayev, L., Khoutorova, L., Atkins, K.D., Eady, T.N., Hong, S., Lu, Y., Obenaus, A., and Bazan, N.G. (2011). Docosahexaenoic Acid therapy of experimental ischemic stroke. In Translational stroke research (Springer-Verlag), pp. 33-41.
Benveniste, E.N. (1998). Cytokine actions in the central nervous system. Cytokine Growth Factor Rev *9*, 259-275.
Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., and Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. Life Sci *65*, 1865-1874.
Berlett, B.S., and Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J Biol Chem *272*, 20313-20316.
Berti, R., Williams, A.J., Moffett, J.R., Hale, S.L., Velarde, L.C., Elliott, P.J., Yao, C., Dave, J.R., and Tortella, F.C. (2002). Quantitative real-time RT-PCR analysis of inflammatory gene expression associated with ischemia-reperfusion brain injury. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *22*, 1068-1079.
Bidmon, H.J., Oermann, E., Schiene, K., Schmitt, M., Kato, K., Asayama, K., Witte, O.W., and Zilles, K. (2000). Unilateral upregulation of cyclooxygenase-2 following cerebral, cortical photothrombosis in the rat: suppression by MK-801 and co-distribution with enzymes involved in the oxidative stress cascade. J Chem Neuroanat *20*, 163-176.
Bloedon, L.T., Balikai, S., Chittams, J., Cunnane, S.C., Berlin, J.A., Rader, D.J., and Szapary, P.O. (2008). Flaxseed and cardiovascular risk factors: results from a double blind, randomized, controlled clinical trial. J Am Coll Nutr *27*, 65-74.
Blondeau, N., Nguemeni, C., Debruyne, D.N., Piens, M., Wu, X., Pan, H., Hu, X., Gandin, C., Lipsky, R.H., Plumier, J.C., *et al*. (2009). Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology *34*, 2548-2559.
Blondeau, N., Petrault, O., Manta, S., Giordanengo, V., Gounon, P., Bordet, R., Lazdunski, M., and Heurteaux, C. (2007). Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. Circulation research *101*, 176-184.
Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M., and Heurteaux, C. (2001). Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. In J Neurosci, pp. 4668-4677.
Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M., and Heurteaux, C. (2002). Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. In Neuroscience, pp. 231-241.
Boast, C.A., Gerhardt, S.C., Pastor, G., Lehmann, J., Etienne, P.E., and Liebman, J.M. (1988). The N-methyl-D-aspartate antagonists CGS 19755 and CPP reduce ischemic brain damage in gerbils. Brain research *442*, 345-348.
Bolland, K., Whitehead, J., Cobo, E., and Secades, J.J. (2009). Evaluation of a sequential global test of improved recovery following stroke as applied to the ICTUS trial of citicoline. Pharm Stat *8*, 136-149.
Bonita, R., Duncan, J., Truelsen, T., Jackson, R.T., and Beaglehole, R. (1999). Passive smoking as well as active smoking increases the risk of acute stroke. Tob Control *8*, 156-160.

Bourre, J.M., Dumont, O., Pascal, G., and Durand, G. (1993). Dietary alpha-linolenic acid at 1.3 g/kg maintains maximal docosahexaenoic acid concentration in brain, heart and liver of adult rats. The Journal of nutrition *123*, 1313-1319.
Bouzan, C., Cohen, J.T., Connor, W.E., Kris-Etherton, P.M., Gray, G.M., Konig, A., Lawrence, R.S., Savitz, D.A., and Teutsch, S.M. (2005). A quantitative analysis of fish consumption and stroke risk. American journal of preventive medicine *29*, 347-352.
Braughler, J.M., and Hall, E.D. (1989). Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. Free radical biology & medicine *6*, 289-301.
Breckenridge, W.C., Gombos, G., and Morgan, I.G. (1972). The lipid composition of adult rat brain synaptosomal plasma membranes. Biochimica et biophysica acta *266*, 695-707.
Brenna, J.T., Salem, N., Jr., Sinclair, A.J., Cunnane, S.C., International Society for the Study of Fatty, A., and Lipids, I. (2009). alpha-Linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids *80*, 85-91.
Brott, T., Marler, J.R., Olinger, C.P., Adams, H.P., Jr., Tomsick, T., Barsan, W.G., Biller, J., Eberle, R., Hertzberg, V., and Walker, M. (1989). Measurements of acute cerebral infarction: lesion size by computed tomography. Stroke *20*, 871-875.
Brouns, R., and De Deyn, P.P. (2009). The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. In Clinical Neurology and Neurosurgery, pp. 483-495.
Bruce, A.J., Boling, W., Kindy, M.S., Peschon, J., Kraemer, P.J., Carpenter, M.K., Holtsberg, F.W., and Mattson, M.P. (1996). Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. Nature medicine *2*, 788-794.
Buga, A.M., Sascau, M., Pisoschi, C., Herndon, J.G., Kessler, C., and Popa-Wagner, A. (2008). The genomic response of the ipsilateral and contralateral cortex to stroke in aged rats. J Cell Mol Med *12*, 2731-2753.
Burns, D.M. (2003). Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease. Progress in cardiovascular diseases *46*, 11-29.
Butcher, L.R., Thomas, A., Backx, K., Roberts, A., Webb, R., and Morris, K. (2008). Low-intensity exercise exerts beneficial effects on plasma lipids via PPARgamma. Med Sci Sports Exerc *40*, 1263-1270.
Buttini, M., Sauter, A., and Boddeke, H.W. (1994). Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat. Brain Res Mol Brain Res *23*, 126-134.
Calder, P.C. (2003). N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. Lipids *38*, 343-352.
Calder, P.C. (2006). Polyunsaturated fatty acids and inflammation. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids *75*, 197-202.
Calder, P.C., and Deckelbaum, R.J. (2011). Harmful, harmless or helpful? The n-6 fatty acid debate goes on. Curr Opin Clin Nutr Metab Care *14*, 113-114.
Campanella, M., Sciorati, C., Tarozzo, G., and Beltramo, M. (2002). Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. Stroke *33*, 586-592.
Campos, H., Baylin, A., and Willett, W.C. (2008). Alpha-linolenic acid and risk of nonfatal acute myocardial infarction. Circulation *118*, 339-345.
Cao, W., Carney, J.M., Duchon, A., Floyd, R.A., and Chevion, M. (1988). Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. Neurosci Lett *88*, 233-238.
Carden, D.L., and Granger, D.N. (2000). Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J Pathol *190*, 255-266.
Carson, A.J., MacHale, S., Allen, K., Lawrie, S.M., Dennis, M., House, A., and Sharpe, M. (2000). Depression after stroke and lesion location: a systematic review. Lancet *356*, 122-126.

Chang, C.Y., Kuan, Y.H., Li, J.R., Chen, W.Y., Ou, Y.C., Pan, H.C., Liao, S.L., Raung, S.L., Chang, C.J., and Chen, C.J. (2013). Docosahexaenoic acid reduces cellular inflammatory response following permanent focal cerebral ischemia in rats. The Journal of nutritional biochemistry *24*, 2127-2137.
Chang, W.H., and Kim, Y.H. (2013). Robot-assisted Therapy in Stroke Rehabilitation. J Stroke *15*, 174-181.
Charo, I.F., and Ransohoff, R.M. (2006). The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. N Engl J Med *354*, 610-621.
Che, X., Ye, W., Panga, L., Wu, D.C., and Yang, G.Y. (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. Brain research *902*, 171-177.
Chen, D., Ding, Y., Schroppel, B., Zhang, N., Fu, S., Chen, D., Zhang, H., and Bromberg, J.S. (2003a). Differential chemokine and chemokine receptor gene induction by ischemia, alloantigen, and gene transfer in cardiac grafts. Am J Transplant *3*, 1216-1229.
Chen, J., Jin, K., Chen, M., Pei, W., Kawaguchi, K., Greenberg, D.A., and Simon, R.P. (1997). Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. J Neurochem *69*, 232-245.
Chen, J., Zhang, Z.G., Li, Y., Wang, Y., Wang, L., Jiang, H., Zhang, C., Lu, M., Katakowski, M., Feldkamp, C.S., *et al*. (2003b). Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. Annals of neurology *53*, 743-751.
Chen, P., Fenet, B., Michaud, S., Tomczyk, N., Vericel, E., Lagarde, M., and Guichardant, M. (2009). Full characterization of PDX, a neuroprotectin/protectin D1 isomer, which inhibits blood platelet aggregation. FEBS Lett *583*, 3478-3484.
Chen, P., Vericel, E., Lagarde, M., and Guichardant, M. (2011). Poxytrins, a class of oxygenated products from polyunsaturated fatty acids, potently inhibit blood platelet aggregation. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *25*, 382-388.
Chevreul, K., Durand-Zaleski, I., Gouepo, A., Fery-Lemonnier, E., Hommel, M., and Woimant, F. (2013). Cost of stroke in France. European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies *20*, 1094-1100.
Chew, E.Y., Clemons, T.E., Agron, E., Launer, L.J., Grodstein, F., Bernstein, P.S., and Age-Related Eye Disease Study 2 Research, G. (2015). Effect of Omega-3 Fatty Acids, Lutein/Zeaxanthin, or Other Nutrient Supplementation on Cognitive Function: The AREDS2 Randomized Clinical Trial. JAMA *314*, 791-801.
Chobanian, A.V., Bakris, G.L., Black, H.R., Cushman, W.C., Green, L.A., Izzo, J.L., Jr., Jones, D.W., Materson, B.J., Oparil, S., Wright, J.T., Jr., *et al*. (2003). The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. JAMA *289*, 2560-2572.
Choi, D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron *1*, 623-634.
Choi, D.W. (1995). Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. Trends Neurosci *18*, 58-60.
Choi, D.W. (1996). Ischemia-induced neuronal apoptosis. Curr Opin Neurobiol *6*, 667-672.
Chopp, M., Li, Y., and Zhang, Z.G. (2009). Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies. Stroke *40*, S143-145.
Cipolla, M.J., Crete, R., Vitullo, L., and Rix, R.D. (2004). Transcellular transport as a mechanism of blood-brain barrier disruption during stroke. Front Biosci *9*, 777-785.

Clark, W.M., Warach, S.J., Pettigrew, L.C., Gammans, R.E., and Sabounjian, L.A. (1997). A randomized dose-response trial of citicoline in acute ischemic stroke patients. Citicoline Stroke Study Group. Neurology *49*, 671-678.
Clark, W.M., Wechsler, L.R., Sabounjian, L.A., Schwiderski, U.E., and Citicoline Stroke Study, G. (2001). A phase III randomized efficacy trial of 2000 mg citicoline in acute ischemic stroke patients. Neurology *57*, 1595-1602.
Clark, W.M., Williams, B.J., Selzer, K.A., Zweifler, R.M., Sabounjian, L.A., and Gammans, R.E. (1999). A randomized efficacy trial of citicoline in patients with acute ischemic stroke. Stroke *30*, 2592-2597.
Clausen, B.H., Lambertsen, K.L., Babcock, A.A., Holm, T.H., Dagnaes-Hansen, F., and Finsen, B. (2008). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. Journal of neuroinflammation *5*, 46.
Collaboration, F.T. (2003). Poor nutritional status on admission predicts poor outcomes after stroke: observational data from the FOOD trial. Stroke *34*, 1450-1456.
Conductier, G., Brau, F., Viola, A., Langlet, F., Ramkumar, N., Dehouck, B., Lemaire, T., Chapot, R., Lucas, L., Rovere, C., *et al*. (2013). Melanin-concentrating hormone regulates beat frequency of ependymal cilia and ventricular volume. Nature neuroscience *16*, 845-847.
Contreras, A.V., Torres, N., and Tovar, A.R. (2013). PPAR-alpha as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. Adv Nutr *4*, 439-452.
Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *17*, 1195-1214.
Crawford, M.A. (1993). The role of essential fatty acids in neural development: implications for perinatal nutrition. The American journal of clinical nutrition *57*, 703S-709S; discussion 709S-710S.
Cruz-Flores, S., Rabinstein, A., Biller, J., Elkind, M.S., Griffith, P., Gorelick, P.B., Howard, G., Leira, E.C., Morgenstern, L.B., Ovbiagele, B., *et al*. (2011). Racial-ethnic disparities in stroke care: the American experience: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke *42*, 2091-2116.
Cullen, B., O'Neill, B., Evans, J.J., Coen, R.F., and Lawlor, B.A. (2007). A review of screening tests for cognitive impairment. J Neurol Neurosurg Psychiatry *78*, 790-799.
Cumming, T.B., Marshall, R.S., and Lazar, R.M. (2013). Stroke, cognitive deficits, and rehabilitation: still an incomplete picture. Int J Stroke *8*, 38-45.
Curtis, M.A., Kam, M., Nannmark, U., Anderson, M.F., Axell, M.Z., Wikkelso, C., Holtas, S., van Roon-Mom, W.M., Bjork-Eriksson, T., Nordborg, C., *et al*. (2007). Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. Science *315*, 1243-1249.
Davalos, A., Castillo, J., Alvarez-Sabin, J., Secades, J.J., Mercadal, J., Lopez, S., Cobo, E., Warach, S., Sherman, D., Clark, W.M., *et al*. (2002). Oral citicoline in acute ischemic stroke: an individual patient data pooling analysis of clinical trials. Stroke *33*, 2850-2857.
Davalos, A., Ricart, W., Gonzalez-Huix, F., Soler, S., Marrugat, J., Molins, A., Suner, R., and Genis, D. (1996). Effect of malnutrition after acute stroke on clinical outcome. Stroke *27*, 1028-1032.
Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. Nature neuroscience *8*, 752-758.
Davies, C.A., Loddick, S.A., Toulmond, S., Stroemer, R.P., Hunt, J., and Rothwell, N.J. (1999). The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. Journal of cerebral blood flow and

metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *19*, 87-98.
Davies, K.J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. J Biol Chem *262*, 9895-9901.
Davis, J.P., Wong, A.A., Schluter, P.J., Henderson, R.D., O'Sullivan, J.D., and Read, S.J. (2004). Impact of premorbid undernutrition on outcome in stroke patients. Stroke *35*, 1930-1934.
De Caterina, R., and Libby, P. (1996). Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. Lipids *31 Suppl*, S57-63.
de Goede, J., Verschuren, W.M.M., Boer, J.M.A., Kromhout, D., and Geleijnse, J.M. (2011). Alpha-linolenic acid intake and 10-year incidence of coronary heart disease and stroke in 20,000 middle-aged men and women in the Netherlands. In PloS one, pp. e17967.
De Lorgeril, M. (2007). Essential polyunsaturated fatty acids, inflammation, atherosclerosis and cardiovascular diseases. Subcell Biochem *42*, 283-297.
de Lorgeril, M., Renaud, S., Mamelle, N., Salen, P., Martin, J.L., Monjaud, I., Guidollet, J., Touboul, P., and Delaye, J. (1994). Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease. Lancet *343*, 1454-1459.
de Lorgeril, M., and Salen, P. (2004). Alpha-linolenic acid and coronary heart disease. Nutr Metab Cardiovasc Dis *14*, 162-169.
de Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J.L., Monjaud, I., Delaye, J., and Mamelle, N. (1999). Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. Circulation *99*, 779-785.
Dedon, P.C. (2008). The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. Chem Res Toxicol *21*, 206-219.
del Zoppo, G.J., and Hallenbeck, J.M. (2000). Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. Thromb Res *98*, 73-81.
del Zoppo, G.J., Schmid-Schonbein, G.W., Mori, E., Copeland, B.R., and Chang, C.M. (1991). Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. Stroke *22*, 1276-1283.
Denes, A., Thornton, P., Rothwell, N.J., and Allan, S.M. (2010). Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. Brain, behavior, and immunity *24*, 708-723.
Denes, A., Vidyasagar, R., Feng, J., Narvainen, J., McColl, B.W., Kauppinen, R.A., and Allan, S.M. (2007). Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *27*, 1941-1953.
Dennis, M.S., Lewis, S.C., Warlow, C., and Collaboration, F.T. (2005). Routine oral nutritional supplementation for stroke patients in hospital (FOOD): a multicentre randomised controlled trial. Lancet *365*, 755-763.
Diener, H.C., Bogousslavsky, J., Brass, L.M., Cimminiello, C., Csiba, L., Kaste, M., Leys, D., Matias-Guiu, J., Rupprecht, H.J., and investigators, M. (2004). Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet *364*, 331-337.
Dimitrijevic, O.B., Stamatovic, S.M., Keep, R.F., and Andjelkovic, A.V. (2007). Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. Stroke *38*, 1345-1353.
Dirnagl, U. (2006). Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *26*, 1465-1478.

Dirnagl, U., Iadecola, C., and Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. In Trends Neurosci, pp. 391-397.
Dirnagl, U., Simon, R.P., and Hallenbeck, J.M. (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. Trends Neurosci *26*, 248-254.
Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *17*, 5046-5061.
Dong, Y., and Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. Glia *36*, 180-190.
Drake, C., Boutin, H., Jones, M.S., Denes, A., McColl, B.W., Selvarajah, J.R., Hulme, S., Georgiou, R.F., Hinz, R., Gerhard, A., *et al*. (2011). Brain inflammation is induced by co-morbidities and risk factors for stroke. Brain, behavior, and immunity *25*, 1113-1122.
Duffy, S., So, A., and Murphy, T.H. (1998). Activation of endogenous antioxidant defenses in neuronal cells prevents free radical-mediated damage. J Neurochem *71*, 69-77.
Dugan, L.L., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M., Handran, S.D., Rothman, S.M., Lin, T.S., Goldberg, M.P., and Choi, D.W. (1995). Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *15*, 6377-6388.
Duprat, F., Lesage, F., Patel, A.J., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. Mol Pharmacol *57*, 906-912.
Dyerberg, J., Bang, H.O., and Hjorne, N. (1975). Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. The American journal of clinical nutrition *28*, 958-966.
Dyerberg, J., Bang, H.O., Stoffersen, E., Moncada, S., and Vane, J.R. (1978). Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? Lancet *2*, 117-119.
Eady, T.N., Khoutorova, L., Atkins, K.D., Bazan, N.G., and Belayev, L. (2012). Docosahexaenoic acid complexed to human albumin in experimental stroke: neuroprotective efficacy with a wide therapeutic window. Experimental & translational stroke medicine *4*, 19.
EAFT, E.A.F.T. (1993). Secondary prevention in non-rheumatic atrial fibrillation after transient ischaemic attack or minor stroke. EAFT (European Atrial Fibrillation Trial) Study Group. Lancet *342*, 1255-1262.
Ekici, F., Ozyurt, B., and Erdogan, H. (2009). The combination of vitamin D3 and dehydroascorbic acid administration attenuates brain damage in focal ischemia. Neurol Sci *30*, 207-212.
ElAli, A., Theriault, P., and Rivest, S. (2014). The role of pericytes in neurovascular unit remodeling in brain disorders. International journal of molecular sciences *15*, 6453-6474.
Emsley, H.C., Smith, C.J., Georgiou, R.F., Vail, A., Hopkins, S.J., Rothwell, N.J., Tyrrell, P.J., and Acute Stroke, I. (2005). A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. J Neurol Neurosurg Psychiatry *76*, 1366-1372.
Endoh, M., Maiese, K., and Wagner, J. (1994). Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. Brain research *651*, 92-100.
Endres, S., Ghorbani, R., Kelley, V.E., Georgilis, K., Lonnemann, G., van der Meer, J.W., Cannon, J.G., Rogers, T.S., Klempner, M.S., Weber, P.C., *et al*. (1989). The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. N Engl J Med *320*, 265-271.
Eng, J.J., and Tang, P.F. (2007). Gait training strategies to optimize walking ability in people with stroke: a synthesis of the evidence. Expert Rev Neurother *7*, 1417-1436.

Enzinger, C., Dawes, H., Johansen-Berg, H., Wade, D., Bogdanovic, M., Collett, J., Guy, C., Kischka, U., Ropele, S., Fazekas, F., *et al*. (2009). Brain activity changes associated with treadmill training after stroke. Stroke *40*, 2460-2467.
Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvado, J., Covas, M.I., Corella, D., Aros, F., Gomez-Gracia, E., Ruiz-Gutierrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., *et al*. (2013). Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. N Engl J Med *368*, 1279-1290.
Ettaiche, M., Fillacier, K., Widmann, C., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1999). Riluzole improves functional recovery after ischemia in the rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci *40*, 729-736.
European Stroke Organisation Executive, C., and Committee, E.S.O.W. (2008). Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. Cerebrovascular diseases *25*, 457-507.
Evarts, E.V., and Wise, S.P. (1984). Basal ganglia outputs and motor control. Ciba Found Symp *107*, 83-102.
Fagard, R.H. (2006). Exercise is good for your blood pressure: effects of endurance training and resistance training. Clin Exp Pharmacol Physiol *33*, 853-856.
Falsetti, P., Acciai, C., Palilla, R., Bosi, M., Carpinteri, F., Zingarelli, A., Pedace, C., and Lenzi, L. (2009). Oropharyngeal dysphagia after stroke: incidence, diagnosis, and clinical predictors in patients admitted to a neurorehabilitation unit. J Stroke Cerebrovasc Dis *18*, 329-335.
Feigin, V.L., Lawes, C.M., Bennett, D.A., Barker-Collo, S.L., and Parag, V. (2009). Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. The Lancet Neurology *8*, 355-369.
Feinstein, M., Ning, H., Kang, J., Bertoni, A., Carnethon, M., and Lloyd-Jones, D.M. (2012). Racial differences in risks for first cardiovascular events and noncardiovascular death: the Atherosclerosis Risk in Communities study, the Cardiovascular Health Study, and the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. Circulation *126*, 50-59.
Feldman, H., Levy, A.R., Hsiung, G.Y., Peters, K.R., Donald, A., Black, S.E., Bouchard, R.W., Gauthier, S.G., Guzman, D.A., Hogan, D.B., *et al*. (2003). A Canadian cohort study of cognitive impairment and related dementias (ACCORD): study methods and baseline results. Neuroepidemiology *22*, 265-274.
Ferrucci, L., Cherubini, A., Bandinelli, S., Bartali, B., Corsi, A., Lauretani, F., Martin, A., Andres-Lacueva, C., Senin, U., and Guralnik, J.M. (2006). Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. J Clin Endocrinol Metab *91*, 439-446.
Finestone, H.M., Greene-Finestone, L.S., Wilson, E.S., and Teasell, R.W. (1996). Prolonged length of stay and reduced functional improvement rate in malnourished stroke rehabilitation patients. Arch Phys Med Rehabil *77*, 340-345.
Fink, K., Zhu, J., Namura, S., Shimizu-Sasamata, M., Endres, M., Ma, J., Dalkara, T., Yuan, J., and Moskowitz, M.A. (1998a). Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *18*, 1071-1076.
Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M., and Lazdunski, M. (1998b). A neuronal two P domain K+ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. EMBO J *17*, 3297-3308.
Fischer, S., Clauss, M., Wiesnet, M., Renz, D., Schaper, W., and Karliczek, G.F. (1999). Hypoxia induces permeability in brain microvessel endothelial cells via VEGF and NO. Am J Physiol *276*, C812-820.

Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D.W., Hurn, P.D., Kent, T.A., Savitz, S.I., Lo, E.H., and Group, S. (2009). Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. Stroke *40*, 2244-2250.
Flammer, A.J., and Luscher, T.F. (2010). Human endothelial dysfunction: EDRFs. Pflugers Arch *459*, 1005-1013.
Fletcher, G.F. (1994). Exercise in the prevention of stroke. Health Rep *6*, 106-110.
Fonarow, G.C., Srikanthan, P., Costanzo, M.R., Cintron, G.B., Lopatin, M., Committee, A.S.A., and Investigators (2007). An obesity paradox in acute heart failure: analysis of body mass index and inhospital mortality for 108,927 patients in the Acute Decompensated Heart Failure National Registry. Am Heart J *153*, 74-81.
Ford, A.L., Goodsall, A.L., Hickey, W.F., and Sedgwick, J.D. (1995). Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. J Immunol *154*, 4309-4321.
Forman, B.M., Chen, J., and Evans, R.M. (1997). Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *94*, 4312-4317.
Forster, C., Clark, H.B., Ross, M.E., and Iadecola, C. (1999). Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts. Acta neuropathologica *97*, 215-220.
Freret, T., Schumann-Bard, P., Boulouard, M., and Bouet, V. (2011). On the importance of long-term functional assessment after stroke to improve translation from bench to bedside. In Experimental & translational stroke medicine (BioMed Central Ltd), pp. 6.
Fung, T.T., Chiuve, S.E., McCullough, M.L., Rexrode, K.M., Logroscino, G., and Hu, F.B. (2008). Adherence to a DASH-style diet and risk of coronary heart disease and stroke in women. Arch Intern Med *168*, 713-720.
Fung, T.T., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Rexrode, K.M., Willett, W.C., and Hu, F.B. (2004). Prospective study of major dietary patterns and stroke risk in women. Stroke *35*, 2014-2019.
Furlan, M., Marchal, G., Viader, F., Derlon, J.M., and Baron, J.C. (1996). Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. Annals of neurology *40*, 216-226.
Gaede, P., Lund-Andersen, H., Parving, H.H., and Pedersen, O. (2008). Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. N Engl J Med *358*, 580-591.
Galan, P., Kesse-Guyot, E., Czernichow, S., Briancon, S., Blacher, J., Hercberg, S., and Group, S.F.O.C. (2010). Effects of B vitamins and omega 3 fatty acids on cardiovascular diseases: a randomised placebo controlled trial. Bmj *341*, c6273.
Galimanis, A., Mono, M.L., Arnold, M., Nedeltchev, K., and Mattle, H.P. (2009). Lifestyle and stroke risk: a review. Current opinion in neurology *22*, 60-68.
Garcia, J.H., Liu, K.F., and Relton, J.K. (1995). Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion. Am J Pathol *147*, 1477-1486.
Garcia-Bonilla, L., Moore, J.M., Racchumi, G., Zhou, P., Butler, J.M., Iadecola, C., and Anrather, J. (2014). Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice. J Immunol *193*, 2531-2537.
Gariballa, S.E., Parker, S.G., Taub, N., and Castleden, C.M. (1998a). Influence of nutritional status on clinical outcome after acute stroke. The American journal of clinical nutrition *68*, 275-281.
Gariballa, S.E., Parker, S.G., Taub, N., and Castleden, C.M. (1998b). A randomized, controlled, a single-blind trial of nutritional supplementation after acute stroke. JPEN J Parenter Enteral Nutr *22*, 315-319.

Garlichs, C.D., Kozina, S., Fateh-Moghadam, S., Handschu, R., Tomandl, B., Stumpf, C., Eskafi, S., Raaz, D., Schmeisser, A., Yilmaz, A., *et al.* (2003). Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. Stroke *34*, 1412-1418.
Gasche, Y., Copin, J.C., Sugawara, T., Fujimura, M., and Chan, P.H. (2001). Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *21*, 1393-1400.
Gebauer, S.K., Psota, T.L., Harris, W.S., and Kris-Etherton, P.M. (2006). n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. The American journal of clinical nutrition *83*, 1526S-1535S.
Gelderblom, M., Leypoldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C.U., Siler, D.A., Arumugam, T.V., Orthey, E., Gerloff, C., Tolosa, E., *et al.* (2009). Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. Stroke *40*, 1849-1857.
Geleijnse, J.M., Giltay, E.J., Grobbee, D.E., Donders, A.R., and Kok, F.J. (2002). Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. J Hypertens *20*, 1493-1499.
Ghosh, S., Novak, E.M., and Innis, S.M. (2007). Cardiac proinflammatory pathways are altered with different dietary n-6 linoleic to n-3 alpha-linolenic acid ratios in normal, fat-fed pigs. Am J Physiol Heart Circ Physiol *293*, H2919-2927.
Gibney, M.J., and Hunter, B. (1993). The effects of short- and long-term supplementation with fish oil on the incorporation of n-3 polyunsaturated fatty acids into cells of the immune system in healthy volunteers. Eur J Clin Nutr *47*, 255-259.
Gidday, J.M., Gasche, Y.G., Copin, J.C., Shah, A.R., Perez, R.S., Shapiro, S.D., Chan, P.H., and Park, T.S. (2005). Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. Am J Physiol Heart Circ Physiol *289*, H558-568.
Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., *et al.* (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. Science *330*, 841-845.
Ginsberg, M.D. (2008). Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. Neuropharmacology *55*, 363-389.
Ginsberg, M.D., and Busto, R. (1998). Combating hyperthermia in acute stroke: a significant clinical concern. Stroke *29*, 529-534.
Giulian, D., Corpuz, M., Chapman, S., Mansouri, M., and Robertson, C. (1993). Reactive mononuclear phagocytes release neurotoxins after ischemic and traumatic injury to the central nervous system. Journal of neuroscience research *36*, 681-693.
Goldberg, M.P., and Choi, D.W. (1993). Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. In J Neurosci, pp. 3510-3524.
Goldstein, L.B., Adams, R., Alberts, M.J., Appel, L.J., Brass, L.M., Bushnell, C.D., Culebras, A., Degraba, T.J., Gorelick, P.B., Guyton, J.R., *et al.* (2006). Primary prevention of ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council: cosponsored by the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease Interdisciplinary Working Group; Cardiovascular Nursing Council; Clinical Cardiology Council; Nutrition, Physical Activity, and Metabolism Council; and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. Stroke *37*, 1583-1633.
Gomez, C.R. (1993). Editorial: Time is brain! J Stroke Cerebrovasc Dis *3*, 1-2.

Gong, C., Qin, Z., Betz, A.L., Liu, X.H., and Yang, G.Y. (1998). Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. Brain research *801*, 1-8.
Gouix, E., Buisson, A., Nieoullon, A., Kerkerian-Le Goff, L., Tauskela, J.S., Blondeau, N., and Had-Aissouni, L. (2014). Oxygen glucose deprivation-induced astrocyte dysfunction provokes neuronal death through oxidative stress. Pharmacol Res *87*, 8-17.
Gould, E., Tanapat, P., Hastings, N.B., and Shors, T.J. (1999). Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. Trends Cogn Sci *3*, 186-192.
Green, D.R., and Reed, J.C. (1998). Mitochondria and apoptosis. Science *281*, 1309-1312.
Greenberg, D.A., and Jin, K. (2006). Growth factors and stroke. NeuroRx *3*, 458-465.
Gregersen, R., Lambertsen, K., and Finsen, B. (2000). Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *20*, 53-65.
Grey, A., and Bolland, M. (2014). Clinical trial evidence and use of fish oil supplements. JAMA Intern Med *174*, 460-462.
Group, E.S., Halkes, P.H., van Gijn, J., Kappelle, L.J., Koudstaal, P.J., and Algra, A. (2006). Aspirin plus dipyridamole versus aspirin alone after cerebral ischaemia of arterial origin (ESPRIT): randomised controlled trial. Lancet *367*, 1665-1673.
Group, T.A.N.S. (1992). Clinical trial of nimodipine in acute ischemic stroke. The American Nimodipine Study Group. Stroke *23*, 3-8.
Group, T.N.I.o.N.D.a.S.r.-P.S.S. (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. N Engl J Med *333*, 1581-1587.
Gunther, A., Kuppers-Tiedt, L., Schneider, P.M., Kunert, I., Berrouschot, J., Schneider, D., and Rossner, S. (2005). Reduced infarct volume and differential effects on glial cell activation after hyperbaric oxygen treatment in rat permanent focal cerebral ischaemia. The European journal of neuroscience *21*, 3189-3194.
Gutermuth, J., Bewersdorff, M., Traidl-Hoffmann, C., Ring, J., Mueller, M.J., Behrendt, H., and Jakob, T. (2007). Immunomodulatory effects of aqueous birch pollen extracts and phytoprostanes on primary immune responses in vivo. J Allergy Clin Immunol *120*, 293-299.
Ha, L., Hauge, T., and Iversen, P.O. (2010). Body composition in older acute stroke patients after treatment with individualized, nutritional supplementation while in hospital. BMC Geriatr *10*, 75.
Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K.R., Medeghri, Z., Machnig, T., *et al.* (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. In N Engl J Med, pp. 1317-1329.
Hackett, M.L., Yapa, C., Parag, V., and Anderson, C.S. (2005). Frequency of depression after stroke: a systematic review of observational studies. Stroke *36*, 1330-1340.
Hadidi, N., Treat-Jacobson, D.J., and Lindquist, R. (2009). Poststroke depression and functional outcome: a critical review of literature. Heart Lung *38*, 151-162.
Haley, E.C., Jr. (1998). High-dose tirilazad for acute stroke (RANTTAS II). RANTTAS II Investigators. Stroke *29*, 1256-1257.
Hallenbeck, J.M. (2002). The many faces of tumor necrosis factor in stroke. Nature medicine *8*, 1363-1368.
Halsey, J.H., Jr. (1988). Prognosis of acute hemiplegia estimated by transcranial Doppler ultrasonography. Stroke *19*, 648-649.
Hamann, G.F., Okada, Y., Fitridge, R., and del Zoppo, G.J. (1995). Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. Stroke *26*, 2120-2126.

Hanisch, U.K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. Nature neuroscience *10*, 1387-1394.
Hankey, G.J. (1999). Smoking and risk of stroke. J Cardiovasc Risk *6*, 207-211.
Hao, Z., Wang, D., Zeng, Y., and Liu, M. (2013). Repetitive transcranial magnetic stimulation for improving function after stroke. Cochrane Database Syst Rev *5*, CD008862.
Hara, H., Friedlander, R.M., Gagliardini, V., Ayata, C., Fink, K., Huang, Z., Shimizu-Sasamata, M., Yuan, J., and Moskowitz, M.A. (1997). Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *94*, 2007-2012.
Harris, W.S., Kris-Etherton, P.M., and Harris, K.A. (2008a). Intakes of long-chain omega-3 fatty acid associated with reduced risk for death from coronary heart disease in healthy adults. Curr Atheroscler Rep *10*, 503-509.
Harris, W.S., Miller, M., Tighe, A.P., Davidson, M.H., and Schaefer, E.J. (2008b). Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives. Atherosclerosis *197*, 12-24.
Harris, W.S., Poston, W.C., and Haddock, C.K. (2007). Tissue n-3 and n-6 fatty acids and risk for coronary heart disease events. Atherosclerosis *193*, 1-10.
Harrison, J.K., Jiang, Y., Chen, S., Xia, Y., Maciejewski, D., McNamara, R.K., Streit, W.J., Salafranca, M.N., Adhikari, S., Thompson, D.A., *et al*. (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 10896-10901.
Hart, R.G., Tonarelli, S.B., and Pearce, L.A. (2005). Avoiding central nervous system bleeding during antithrombotic therapy: recent data and ideas. Stroke *36*, 1588-1593.
Hawkes, J.S., James, M.J., and Cleland, L.G. (1991). Separation and quantification of PGE3 following derivatization with panacyl bromide by high pressure liquid chromatography with fluorometric detection. Prostaglandins *42*, 355-368.
Hawkins, B.T., and Davis, T.P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. Pharmacol Rev *57*, 173-185.
Hayakawa, K., Nakano, T., Irie, K., Higuchi, S., Fujioka, M., Orito, K., Iwasaki, K., Jin, G., Lo, E.H., Mishima, K., *et al*. (2010). Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *30*, 871-882.
He, F.J., Nowson, C.A., and MacGregor, G.A. (2006). Fruit and vegetable consumption and stroke: meta-analysis of cohort studies. Lancet *367*, 320-326.
He, J., Ogden, L.G., Vupputuri, S., Bazzano, L.A., Loria, C., and Whelton, P.K. (1999). Dietary sodium intake and subsequent risk of cardiovascular disease in overweight adults. JAMA *282*, 2027-2034.
Health, N.I.o. (1998). Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. Obes Res *6 Suppl 2*, 51S-209S.
Heilman, K.M., Maher, L.M., Greenwald, M.L., and Rothi, L.J. (1997). Conceptual apraxia from lateralized lesions. Neurology *49*, 457-464.
Hemsley, G., and Code, C. (1996). Interactions between recovery in aphasia, emotional and psychosocial factors in subjects with aphasia, their significant others and speech pathologists. Disabil Rehabil *18*, 567-584.
Heo, J.H., Lucero, J., Abumiya, T., Koziol, J.A., Copeland, B.R., and del Zoppo, G.J. (1999). Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia.

Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *19*, 624-633.
Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., *et al*. (2004). TREK-1, a K+ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. In EMBO J, pp. 2684-2695.
Heurteaux, C., Laigle, C., Blondeau, N., Jarretou, G., and Lazdunski, M. (2006). Alpha-linolenic acid and riluzole treatment confer cerebral protection and improve survival after focal brain ischemia. Neuroscience *137*, 241-251.
Hewett, S.J., Muir, J.K., Lobner, D., Symons, A., and Choi, D.W. (1996). Potentiation of oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death after induction of iNOS. Stroke *27*, 1586-1591.
Hidler, J., Nichols, D., Pelliccio, M., and Brady, K. (2005). Advances in the understanding and treatment of stroke impairment using robotic devices. Top Stroke Rehabil *12*, 22-35.
Hilari, K., Byng, S., Lamping, D.L., and Smith, S.C. (2003). Stroke and Aphasia Quality of Life Scale-39 (SAQOL-39): evaluation of acceptability, reliability, and validity. Stroke *34*, 1944-1950.
Hjort, N., Wu, O., Ashkanian, M., Solling, C., Mouridsen, K., Christensen, S., Gyldensted, C., Andersen, G., and Ostergaard, L. (2008). MRI detection of early blood-brain barrier disruption: parenchymal enhancement predicts focal hemorrhagic transformation after thrombolysis. Stroke *39*, 1025-1028.
Hochstenbach, J., Mulder, T., van Limbeek, J., Donders, R., and Schoonderwaldt, H. (1998). Cognitive decline following stroke: a comprehensive study of cognitive decline following stroke. J Clin Exp Neuropsychol *20*, 503-517.
Holman, R.T. (1964). Nutritional and Metabolic Interrelationships between Fatty Acids. Fed Proc *23*, 1062-1067.
Holroyd-Leduc, J.M., Kapral, M.K., Austin, P.C., and Tu, J.V. (2000). Sex differences and similarities in the management and outcome of stroke patients. Stroke *31*, 1833-1837.
Hommel, M., Jaillard, A., and Besson, G. (1999). [Role of emergency cerebrovascular units in the network of care]. Rev Neurol (Paris) *155*, 666-669.
Hong, S., Gronert, K., Devchand, P.R., Moussignac, R.L., and Serhan, C.N. (2003). Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. J Biol Chem *278*, 14677-14687.
Hong, S.H., Belayev, L., Khoutorova, L., Obenaus, A., and Bazan, N.G. (2014). Docosahexaenoic acid confers enduring neuroprotection in experimental stroke. Journal of the neurological sciences *338*, 135-141.
Hong, S.H., Khoutorova, L., Bazan, N.G., and Belayev, L. (2015). Docosahexaenoic acid improves behavior and attenuates blood-brain barrier injury induced by focal cerebral ischemia in rats. Experimental & translational stroke medicine *7*, 3.
Hooper, L., Thompson, R.L., Harrison, R.A., Summerbell, C.D., Ness, A.R., Moore, H.J., Worthington, H.V., Durrington, P.N., Higgins, J.P., Capps, N.E., *et al*. (2006). Risks and benefits of omega 3 fats for mortality, cardiovascular disease, and cancer: systematic review. Bmj *332*, 752-760.
Horn, J., de Haan, R.J., Vermeulen, M., and Limburg, M. (2001a). Very Early Nimodipine Use in Stroke (VENUS): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Stroke *32*, 461-465.
Horn, J., de Haan, R.J., Vermeulen, M., Luiten, P.G., and Limburg, M. (2001b). Nimodipine in animal model experiments of focal cerebral ischemia: a systematic review. Stroke *32*, 2433-2438.
Horn, J., and Limburg, M. (2000). Calcium antagonists for acute ischemic stroke. Cochrane Database Syst Rev, CD001928.

Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., and Swanson, P.E. (2009). Cell death. N Engl J Med *361*, 1570-1583.
Howard, V.J., Kleindorfer, D.O., Judd, S.E., McClure, L.A., Safford, M.M., Rhodes, J.D., Cushman, M., Moy, C.S., Soliman, E.Z., Kissela, B.M., *et al*. (2011). Disparities in stroke incidence contributing to disparities in stroke mortality. Annals of neurology *69*, 619-627.
Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R.K., Chen, S., Gao, Y., and Chen, J. (2012). Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. Stroke *43*, 3063-3070.
Huang, J., Upadhyay, U.M., and Tamargo, R.J. (2006). Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. Surg Neurol *66*, 232-245.
Hughes, P.M., Allegrini, P.R., Rudin, M., Perry, V.H., Mir, A.K., and Wiessner, C. (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *22*, 308-317.
Iadecola, C. (1997). Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. Trends Neurosci *20*, 132-139.
Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. In Nature reviews Neuroscience, pp. 347-360.
Iadecola, C., and Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. Nature medicine *17*, 796-808.
Iadecola, C., Forster, C., Nogawa, S., Clark, H.B., and Ross, M.E. (1999). Cyclooxygenase-2 immunoreactivity in the human brain following cerebral ischemia. Acta neuropathologica *98*, 9-14.
Iadecola, C., Niwa, K., Nogawa, S., Zhao, X., Nagayama, M., Araki, E., Morham, S., and Ross, M.E. (2001). Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 1294-1299.
Iadecola, C., Xu, X., Zhang, F., el-Fakahany, E.E., and Ross, M.E. (1995). Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *15*, 52-59.
Iadecola, C., Zhang, F., Casey, R., Nagayama, M., and Ross, M.E. (1997). Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *17*, 9157-9164.
Inose, Y., Kato, Y., Kitagawa, K., Uchiyama, S., and Shibata, N. (2015). Activated microglia in ischemic stroke penumbra upregulate MCP-1 and CCR2 expression in response to lysophosphatidylcholine derived from adjacent neurons and astrocytes. Neuropathology *35*, 209-223.
Iosa, M., Morone, G., Fusco, A., Bragoni, M., Coiro, P., Multari, M., Venturiero, V., De Angelis, D., Pratesi, L., and Paolucci, S. (2012). Seven capital devices for the future of stroke rehabilitation. Stroke research and treatment *2012*, 187965.
Iso, H., Jacobs, D.R., Jr., Wentworth, D., Neaton, J.D., and Cohen, J.D. (1989). Serum cholesterol levels and six-year mortality from stroke in 350,977 men screened for the multiple risk factor intervention trial. N Engl J Med *320*, 904-910.
Iso, H., Rexrode, K.M., Stampfer, M.J., Manson, J.E., Colditz, G.A., Speizer, F.E., Hennekens, C.H., and Willett, W.C. (2001). Intake of fish and omega-3 fatty acids and risk of stroke in women. JAMA *285*, 304-312.
Ivacko, J., Szaflarski, J., Malinak, C., Flory, C., Warren, J.S., and Silverstein, F.S. (1997). Hypoxic-ischemic injury induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in neonatal

rat brain. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *17*, 759-770.
Jagtap, P., and Szabo, C. (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. Nat Rev Drug Discov *4*, 421-440.
Jaillard, A., Grand, S., Le Bas, J.F., and Hommel, M. (2010). Predicting cognitive dysfunctioning in nondemented patients early after stroke. Cerebrovascular diseases *29*, 415-423.
James, P.A., Oparil, S., Carter, B.L., Cushman, W.C., Dennison-Himmelfarb, C., Handler, J., Lackland, D.T., LeFevre, M.L., MacKenzie, T.D., Ogedegbe, O., *et al*. (2014). 2014 evidence-based guideline for the management of high blood pressure in adults: report from the panel members appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). JAMA *311*, 507-520.
Jin, K., Wang, X., Xie, L., Mao, X.O., Zhu, W., Wang, Y., Shen, J., Mao, Y., Banwait, S., and Greenberg, D.A. (2006). Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *103*, 13198-13202.
Jin, R., Yang, G., and Li, G. (2010). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. J Leukoc Biol *87*, 779-789.
Johansson, A., Ahren, B., Nasman, B., Carlstrom, K., and Olsson, T. (2000). Cortisol axis abnormalities early after stroke--relationships to cytokines and leptin. J Intern Med *247*, 179-187.
Johnston, S.C., Mendis, S., and Mathers, C.D. (2009). Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. The Lancet Neurology *8*, 345-354.
Jones, T.H., Morawetz, R.B., Crowell, R.M., Marcoux, F.W., FitzGibbon, S.J., DeGirolami, U., and Ojemann, R.G. (1981). Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. J Neurosurg *54*, 773-782.
Jonsson, A.C., Lindgren, I., Norrving, B., and Lindgren, A. (2008). Weight loss after stroke: a population-based study from the Lund Stroke Register. Stroke *39*, 918-923.
Jorgensen, H.S., Nakayama, H., Raaschou, H.O., and Olsen, T.S. (1995a). Recovery of walking function in stroke patients: the Copenhagen Stroke Study. Arch Phys Med Rehabil *76*, 27-32.
Jorgensen, H.S., Nakayama, H., Raaschou, H.O., Vive-Larsen, J., Stoier, M., and Olsen, T.S. (1995b). Outcome and time course of recovery in stroke. Part I: Outcome. The Copenhagen Stroke Study. Arch Phys Med Rehabil *76*, 399-405.
Jorgensen, H.S., Nakayama, H., Raaschou, H.O., Vive-Larsen, J., Stoier, M., and Olsen, T.S. (1995c). Outcome and time course of recovery in stroke. Part II: Time course of recovery. The Copenhagen Stroke Study. Arch Phys Med Rehabil *76*, 406-412.
Kakar, P., Watson, T., and Lip, G.Y. (2008). New approaches to therapy with omega-3 fatty acids. Curr Atheroscler Rep *10*, 79-87.
Kalra, E.K. (2003). Nutraceutical--definition and introduction. AAPS PharmSci *5*, E25.
Kamangar, F., and Karimi, P. (2013). The state of nutritional epidemiology: why we are still unsure of what we should eat? Arch Iran Med *16*, 483-486.
Kamiya, T., Katayama, Y., Kashiwagi, F., and Terashi, A. (1993). The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. Stroke *24*, 571-575; discussion 575-576.
Kara, H., Akinci, M., Degirmenci, S., Bayir, A., Ak, A., Nayman, A., Unlu, A., Akyurek, F., and Sivri, M. (2014). High-sensitivity C-reactive protein, lipoprotein-related phospholipase A2, and acute ischemic stroke. Neuropsychiatr Dis Treat *10*, 1451-1457.

Karg, K., Dirsch, V.M., Vollmar, A.M., Cracowski, J.L., Laporte, F., and Mueller, M.J. (2007). Biologically active oxidized lipids (phytoprostanes) in the plant diet and parenteral lipid nutrition. Free Radic Res *41*, 25-37.
Karnath, H.O., Rennig, J., Johannsen, L., and Rorden, C. (2011). The anatomy underlying acute versus chronic spatial neglect: a longitudinal study. Brain : a journal of neurology *134*, 903-912.
Kasapis, C., and Thompson, P.D. (2005). The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. J Am Coll Cardiol *45*, 1563-1569.
Kastrup, A., Engelhorn, T., Beaulieu, C., de Crespigny, A., and Moseley, M.E. (1999). Dynamics of cerebral injury, perfusion, and blood-brain barrier changes after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. Journal of the neurological sciences *166*, 91-99.
Kato, H., and Walz, W. (2000). The initiation of the microglial response. Brain Pathol *10*, 137-143.
Katsumata, Y., Shinmura, K., Sugiura, Y., Tohyama, S., Matsuhashi, T., Ito, H., Yan, X., Ito, K., Yuasa, S., Ieda, M., *et al*. (2014). Endogenous prostaglandin D2 and its metabolites protect the heart against ischemia-reperfusion injury by activating Nrf2. Hypertension *63*, 80-87.
Katsura, K., Kristian, T., and Siesjo, B.K. (1994). Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. Biochem Soc Trans *22*, 991-996.
Kaufmann, A.M., Firlik, A.D., Fukui, M.B., Wechsler, L.R., Jungries, C.A., and Yonas, H. (1999). Ischemic core and penumbra in human stroke. Stroke *30*, 93-99.
Kawanokuchi, J., Shimizu, K., Nitta, A., Yamada, K., Mizuno, T., Takeuchi, H., and Suzumura, A. (2008). Production and functions of IL-17 in microglia. Journal of neuroimmunology *194*, 54-61.
Kazda, S., and Towart, R. (1982). Nimodipine: a new calcium antagonistic drug with a preferential cerebrovascular action. Acta neurochirurgica *63*, 259-265.
Kennedy, F.B., Pozen, T.J., Gabelman, E.H., Tuthill, J.E., and Zaentz, S.D. (1970). Stroke intensive care--an appraisal. Am Heart J *80*, 188-196.
Khalfoun, B., Thibault, F., Watier, H., Bardos, P., and Lebranchu, Y. (1997). Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. Adv Exp Med Biol *400B*, 589-597.
Khatri, R., McKinney, A.M., Swenson, B., and Janardhan, V. (2012). Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. Neurology *79*, S52-57.
Kidd, P.M. (2009). Integrated brain restoration after ischemic stroke--medical management, risk factors, nutrients, and other interventions for managing inflammation and enhancing brain plasticity. Altern Med Rev *14*, 14-35.
Kim, D.N., Schmee, J., and Thomas, W.A. (1990). Dietary fish oil added to a hyperlipidemic diet for swine results in reduction in the excessive number of monocytes attached to arterial endothelium. Atherosclerosis *81*, 209-216.
Kim, J.S., Gautam, S.C., Chopp, M., Zaloga, C., Jones, M.L., Ward, P.A., and Welch, K.M. (1995). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. Journal of neuroimmunology *56*, 127-134.
Kim, Y.H., You, S.H., Ko, M.H., Park, J.W., Lee, K.H., Jang, S.H., Yoo, W.K., and Hallett, M. (2006). Repetitive transcranial magnetic stimulation-induced corticomotor excitability and associated motor skill acquisition in chronic stroke. Stroke *37*, 1471-1476.
Kissela, B.M., Khoury, J.C., Alwell, K., Moomaw, C.J., Woo, D., Adeoye, O., Flaherty, M.L., Khatri, P., Ferioli, S., De Los Rios La Rosa, F., *et al*. (2012). Age at stroke: temporal trends in stroke incidence in a large, biracial population. Neurology *79*, 1781-1787.

Kleim, J.A., and Jones, T.A. (2008). Principles of experience-dependent neural plasticity: implications for rehabilitation after brain damage. Journal of speech, language, and hearing research : JSLHR *51*, S225-239.
Kleindorfer, D., Broderick, J., Khoury, J., Flaherty, M., Woo, D., Alwell, K., Moomaw, C.J., Schneider, A., Miller, R., Shukla, R., *et al*. (2006). The unchanging incidence and case-fatality of stroke in the 1990s: a population-based study. Stroke *37*, 2473-2478.
Kleindorfer, D., Lindsell, C., Alwell, K.A., Moomaw, C.J., Woo, D., Flaherty, M.L., Khatri, P., Adeoye, O., Ferioli, S., and Kissela, B.M. (2012). Patients living in impoverished areas have more severe ischemic strokes. Stroke *43*, 2055-2059.
Knapp, H.D., Taub, E., and Berman, A.J. (1958). Effect of deafferentation on a conditioned avoidance response. Science *128*, 842-843.
Konsman, J.P., Parnet, P., and Dantzer, R. (2002). Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. Trends Neurosci *25*, 154-159.
Kouwenhoven, S.E., Kirkevold, M., Engedal, K., and Kim, H.S. (2011). Depression in acute stroke: prevalence, dominant symptoms and associated factors. A systematic literature review. Disabil Rehabil *33*, 539-556.
Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J., and American Heart Association. Nutrition, C. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. Circulation *106*, 2747-2757.
Kriz, J. (2006). Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. Crit Rev Neurobiol *18*, 145-157.
Kromhout, D., Giltay, E.J., Geleijnse, J.M., and Alpha Omega Trial, G. (2010). n-3 fatty acids and cardiovascular events after myocardial infarction. N Engl J Med *363*, 2015-2026.
Kulik, T., Kusano, Y., Aronhime, S., Sandler, A.L., and Winn, H.R. (2008). Regulation of cerebral vasculature in normal and ischemic brain. Neuropharmacology *55*, 281-288.
Kuller, L.H. (2011). The great fat debate: reducing cholesterol. Journal of the American Dietetic Association *111*, 663-664.
Kumai, Y., Ooboshi, H., Takada, J., Kamouchi, M., Kitazono, T., Egashira, K., Ibayashi, S., and Iida, M. (2004). Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy protects against focal brain ischemia in hypertensive rats. J Cereb Blood Flow Metab *24*, 1359-1368.
Kuroda, S., Tsuchidate, R., Smith, M.L., Maples, K.R., and Siesjo, B.K. (1999). Neuroprotective effects of a novel nitrone, NXY-059, after transient focal cerebral ischemia in the rat. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *19*, 778-787.
Kuroiwa, T., Ting, P., Martinez, H., and Klatzo, I. (1985). The biphasic opening of the blood-brain barrier to proteins following temporary middle cerebral artery occlusion. Acta neuropathologica *68*, 122-129.
Kurth, T., Moore, S.C., Gaziano, J.M., Kase, C.S., Stampfer, M.J., Berger, K., and Buring, J.E. (2006). Healthy lifestyle and the risk of stroke in women. Arch Intern Med *166*, 1403-1409.
Kwakkel, G., Kollen, B., and Lindeman, E. (2004a). Understanding the pattern of functional recovery after stroke: facts and theories. Restor Neurol Neurosci *22*, 281-299.
Kwakkel, G., Kollen, B.J., and Krebs, H.I. (2008). Effects of robot-assisted therapy on upper limb recovery after stroke: a systematic review. Neurorehabilitation and neural repair *22*, 111-121.
Kwakkel, G., van Peppen, R., Wagenaar, R.C., Wood Dauphinee, S., Richards, C., Ashburn, A., Miller, K., Lincoln, N., Partridge, C., Wellwood, I., *et al*. (2004b). Effects of augmented exercise therapy time after stroke: a meta-analysis. Stroke *35*, 2529-2539.

Kwakkel, G., Wagenaar, R.C., Twisk, J.W., Lankhorst, G.J., and Koetsier, J.C. (1999). Intensity of leg and arm training after primary middle-cerebral-artery stroke: a randomised trial. Lancet *354*, 191-196.
Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z., and Michel, J.B. (2012). The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. Cardiovasc Res *95*, 194-204.
Lake, A.R., Van Niekerk, I.J., Le Roux, C.G., Trevor-Jones, T.R., and De Wet, P.D. (1990). Angiology of the brain of the baboon Papio ursinus, the vervet monkey Cercopithecus pygerithrus, and the bushbaby Galago senegalensis. Am J Anat *187*, 277-286.
Lalancette-Hebert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y.C., and Kriz, J. (2007). Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *27*, 2596-2605.
Lalancette-Hebert, M., Julien, C., Cordeau, P., Bohacek, I., Weng, Y.C., Calon, F., and Kriz, J. (2011). Accumulation of dietary docosahexaenoic acid in the brain attenuates acute immune response and development of postischemic neuronal damage. Stroke *42*, 2903-2909.
Lalancette-Hebert, M., Swarup, V., Beaulieu, J.M., Bohacek, I., Abdelhamid, E., Weng, Y.C., Sato, S., and Kriz, J. (2012). Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *32*, 10383-10395.
Lambertsen, K.L., Meldgaard, M., Ladeby, R., and Finsen, B. (2005). A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *25*, 119-135.
Langhorne, P., Bernhardt, J., and Kwakkel, G. (2011). Stroke rehabilitation. Lancet *377*, 1693-1702.
Langhorne, P., Coupar, F., and Pollock, A. (2009). Motor recovery after stroke: a systematic review. The Lancet Neurology *8*, 741-754.
Langhorne, P., Williams, B.O., Gilchrist, W., and Howie, K. (1993). Do stroke units save lives? Lancet *342*, 395-398.
Lapchak, P.A., Chapman, D.F., and Zivin, J.A. (2001). Pharmacological effects of the spin trap agents N-t-butyl-phenylnitrone (PBN) and 2,2,6, 6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) in a rabbit thromboembolic stroke model: combination studies with the thrombolytic tissue plasminogen activator. Stroke *32*, 147-153.
Larsson, S.C., and Orsini, N. (2011). Fish consumption and the risk of stroke: a dose-response meta-analysis. Stroke *42*, 3621-3623.
Larsson, S.C., Orsini, N., and Wolk, A. (2011a). Dietary potassium intake and risk of stroke: a dose-response meta-analysis of prospective studies. Stroke *42*, 2746-2750.
Larsson, S.C., Virtamo, J., and Wolk, A. (2011b). Red meat consumption and risk of stroke in Swedish men. The American journal of clinical nutrition *94*, 417-421.
Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. In EMBO J, pp. 1784-1793.
Laver, K.E., George, S., Thomas, S., Deutsch, J.E., and Crotty, M. (2015). Virtual reality for stroke rehabilitation. Cochrane Database Syst Rev *2*, CD008349.
Le Thuc, O., Blondeau, N., Nahon, J.L., and Rovere, C. (2015). The complex contribution of chemokines to neuroinflammation: switching from beneficial to detrimental effects. Ann N Y Acad Sci *1351*, 127-140.
Lee, J.M., Zipfel, G.J., and Choi, D.W. (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. Nature *399*, A7-14.

Lee, L.K., Bateman, B.T., Wang, S., Schumacher, H.C., Pile-Spellman, J., and Saposnik, G. (2012). Trends in the hospitalization of ischemic stroke in the United States, 1998-2007. Int J Stroke *7*, 195-201.
Lee, T.H., Hoover, R.L., Williams, J.D., Sperling, R.I., Ravalese, J., 3rd, Spur, B.W., Robinson, D.R., Corey, E.J., Lewis, R.A., and Austen, K.F. (1985). Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. N Engl J Med *312*, 1217-1224.
Lee, T.H., Menica-Huerta, J.M., Shih, C., Corey, E.J., Lewis, R.A., and Austen, K.F. (1984). Characterization and biologic properties of 5,12-dihydroxy derivatives of eicosapentaenoic acid, including leukotriene B5 and the double lipoxygenase product. J Biol Chem *259*, 2383-2389.
Lees, K.R., Zivin, J.A., Ashwood, T., Davalos, A., Davis, S.M., Diener, H.C., Grotta, J., Lyden, P., Shuaib, A., Hardemark, H.G.*, et al*. (2006). NXY-059 for acute ischemic stroke. N Engl J Med *354*, 588-600.
Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F.E., Ratan, R., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J., and Vartanian, T. (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *100*, 8514-8519.
Leist, M., and Nicotera, P. (1998). Calcium and neuronal death. Rev Physiol Biochem Pharmacol *132*, 79-125.
Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S., and Nicotera, P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. J Exp Med *185*, 1481-1486.
Lesage, F., and Lazdunski, M. (2000). Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. Am J Physiol Renal Physiol *279*, F793-801.
Lesage, F., Terrenoire, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K+ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. J Biol Chem *275*, 28398-28405.
Lewington, S., Clarke, R., Qizilbash, N., Peto, R., Collins, R., and Prospective Studies, C. (2002). Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. Lancet *360*, 1903-1913.
Li, Q., Zhang, Q., Wang, M., Liu, F., Zhao, S., Ma, J., Luo, N., Li, N., Li, Y., Xu, G.*, et al*. (2007). Docosahexaenoic acid affects endothelial nitric oxide synthase in caveolae. Arch Biochem Biophys *466*, 250-259.
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. Nature neuroscience *13*, 1496-1504.
Li, X.Y., Cai, X.L., Bian, P.D., and Hu, L.R. (2012). High salt intake and stroke: meta-analysis of the epidemiologic evidence. CNS Neurosci Ther *18*, 691-701.
Liebeskind, D.S. (2010). Reperfusion for acute ischemic stroke: arterial revascularization and collateral therapeutics. Current opinion in neurology *23*, 36-45.
Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., Giese, T., and Veltkamp, R. (2009). Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. Nature medicine *15*, 192-199.
Lin, P.Y., Chiu, C.C., Huang, S.Y., and Su, K.P. (2012). A meta-analytic review of polyunsaturated fatty acid compositions in dementia. J Clin Psychiatry *73*, 1245-1254.

Lindsberg, P.J., Carpen, O., Paetau, A., Karjalainen-Lindsberg, M.L., and Kaste, M. (1996). Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. Circulation *94*, 939-945.
Lindsberg, P.J., Hallenbeck, J.M., and Feuerstein, G. (1991). Platelet-activating factor in stroke and brain injury. Annals of neurology *30*, 117-129.
Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. Physiol Rev *79*, 1431-1568.
Liu, H.C., Zheng, M.H., Du, Y.L., Wang, L., Kuang, F., Qin, H.Y., Zhang, B.F., and Han, H. (2012). N9 microglial cells polarized by LPS and IL4 show differential responses to secondary environmental stimuli. Cell Immunol *278*, 84-90.
Liu, M., Boussetta, T., Makni-Maalej, K., Fay, M., Driss, F., El-Benna, J., Lagarde, M., and Guichardant, M. (2014). Protectin DX, a double lipoxygenase product of DHA, inhibits both ROS production in human neutrophils and cyclooxygenase activities. Lipids *49*, 49-57.
Liu, T., Clark, R.K., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Barone, F.C., and Feuerstein, G.Z. (1994). Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. Stroke *25*, 1481-1488.
Liu, T., McDonnell, P.C., Young, P.R., White, R.F., Siren, A.L., Hallenbeck, J.M., Barone, F.C., and Feurestein, G.Z. (1993). Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex. Stroke *24*, 1746-1750; discussion 1750-1741.
Liu, X.S., Zhang, Z.G., Zhang, R.L., Gregg, S., Morris, D.C., Wang, Y., and Chopp, M. (2007a). Stroke induces gene profile changes associated with neurogenesis and angiogenesis in adult subventricular zone progenitor cells. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *27*, 564-574.
Liu, Z., Li, Y., Qu, R., Shen, L., Gao, Q., Zhang, X., Lu, M., Savant-Bhonsale, S., Borneman, J., and Chopp, M. (2007b). Axonal sprouting into the denervated spinal cord and synaptic and postsynaptic protein expression in the spinal cord after transplantation of bone marrow stromal cell in stroke rats. Brain research *1149*, 172-180.
Lo, E.H. (2008). Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. British journal of pharmacology *153 Suppl 1*, S396-405.
Loddick, S.A., Turnbull, A.V., and Rothwell, N.J. (1998). Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *18*, 176-179.
Loeffler, C., Berger, S., Guy, A., Durand, T., Bringmann, G., Dreyer, M., von Rad, U., Durner, J., and Mueller, M.J. (2005). B1-phytoprostanes trigger plant defense and detoxification responses. Plant Physiol *137*, 328-340.
Lukic-Panin, V., Deguchi, K., Yamashita, T., Shang, J., Zhang, X., Tian, F., Liu, N., Kawai, H., Matsuura, T., and Abe, K. (2010). Free radical scavenger edaravone administration protects against tissue plasminogen activator induced oxidative stress and blood brain barrier damage. Curr Neurovasc Res *7*, 319-329.
Macas, J., Nern, C., Plate, K.H., and Momma, S. (2006). Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *26*, 13114-13119.
MacMahon, S., Peto, R., Cutler, J., Collins, R., Sorlie, P., Neaton, J., Abbott, R., Godwin, J., Dyer, A., and Stamler, J. (1990). Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. Lancet *335*, 765-774.
Marckmann, P., and Gronbaek, M. (1999). Fish consumption and coronary heart disease mortality. A systematic review of prospective cohort studies. Eur J Clin Nutr *53*, 585-590.

Mariani, V., Gilles, S., Jakob, T., Thiel, M., Mueller, M.J., Ring, J., Behrendt, H., and Traidl-Hoffmann, C. (2007). Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction. J Immunol *178*, 7623-7631.
Marler, J.R., Tilley, B.C., Lu, M., Brott, T.G., Lyden, P.C., Grotta, J.C., Broderick, J.P., Levine, S.R., Frankel, M.P., Horowitz, S.H., *et al*. (2000). Early stroke treatment associated with better outcome: the NINDS rt-PA stroke study. Neurology *55*, 1649-1655.
Marsden, V.S., and Strasser, A. (2003). Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. Annu Rev Immunol *21*, 71-105.
Mattle, H., Grolimund, P., Huber, P., Sturzenegger, M., and Zurbrugg, H.R. (1988). Transcranial Doppler sonographic findings in middle cerebral artery disease. Arch Neurol *45*, 289-295.
Maysami, S., Haley, M.J., Gorenkova, N., Krishnan, S., McColl, B.W., and Lawrence, C.B. (2015). Prolonged diet-induced obesity in mice modifies the inflammatory response and leads to worse outcome after stroke. Journal of neuroinflammation *12*, 140.
McCann, J.C., and Ames, B.N. (2005). Is docosahexaenoic acid, an n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. The American journal of clinical nutrition *82*, 281-295.
McCord, J.M. (1985). Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med *312*, 159-163.
McCoy, M.K., and Tansey, M.G. (2008). TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. Journal of neuroinflammation *5*, 45.
Mehra, A., Ali, C., Parcq, J., Vivien, D., and Docagne, F. (2015). The plasminogen activation system in neuroinflammation. Biochimica et biophysica acta.
Mehrholz, J., Hadrich, A., Platz, T., Kugler, J., and Pohl, M. (2012). Electromechanical and robot-assisted arm training for improving generic activities of daily living, arm function, and arm muscle strength after stroke. Cochrane Database Syst Rev *6*, CD006876.
Mhairi Macrae, I. (1992). New models of focal cerebral ischaemia. British journal of clinical pharmacology *34*, 302-308.
Micha, R., Wallace, S.K., and Mozaffarian, D. (2010). Red and processed meat consumption and risk of incident coronary heart disease, stroke, and diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. Circulation *121*, 2271-2283.
Michelucci, A., Heurtaux, T., Grandbarbe, L., Morga, E., and Heuschling, P. (2009). Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. Journal of neuroimmunology *210*, 3-12.
Miles, E.A., Thies, F., Wallace, F.A., Powell, J.R., Hurst, T.L., Newsholme, E.A., and Calder, P.C. (2001). Influence of age and dietary fish oil on plasma soluble adhesion molecule concentrations. Clin Sci (Lond) *100*, 91-100.
Miles, E.A., Wallace, F.A., and Calder, P.C. (2000). Dietary fish oil reduces intercellular adhesion molecule 1 and scavenger receptor expression on murine macrophages. Atherosclerosis *152*, 43-50.
Minami, M., and Satoh, M. (2003). Chemokines and their receptors in the brain: pathophysiological roles in ischemic brain injury. Life Sci *74*, 321-327.
Minghetti, L., Salvi, R., Lavinia Salvatori, M., Ajmone-Cat, M.A., De Nuccio, C., Visentin, S., Bultel-Ponce, V., Oger, C., Guy, A., Galano, J.M., *et al*. (2014). Nonenzymatic oxygenated metabolites of alpha-linolenic acid B1- and L1-phytoprostanes protect immature neurons from oxidant injury and promote differentiation of oligodendrocyte progenitors through PPAR-gamma activation. Free radical biology & medicine *73*, 41-50.

Mitsios, N., Gaffney, J., Krupinski, J., Mathias, R., Wang, Q., Hayward, S., Rubio, F., Kumar, P., Kumar, S., and Slevin, M. (2007). Expression of signaling molecules associated with apoptosis in human ischemic stroke tissue. Cell Biochem Biophys *47*, 73-86.
Mocco, J., Choudhri, T., Huang, J., Harfeldt, E., Efros, L., Klingbeil, C., Vexler, V., Hall, W., Zhang, Y., Mack, W., *et al*. (2002). HuEP5C7 as a humanized monoclonal anti-E/P-selectin neurovascular protective strategy in a blinded placebo-controlled trial of nonhuman primate stroke. Circulation research *91*, 907-914.
Mohr, J.P., Thompson, J.L., Lazar, R.M., Levin, B., Sacco, R.L., Furie, K.L., Kistler, J.P., Albers, G.W., Pettigrew, L.C., Adams, H.P., Jr., *et al*. (2001). A comparison of warfarin and aspirin for the prevention of recurrent ischemic stroke. N Engl J Med *345*, 1444-1451.
Montaner, J., Alvarez-Sabin, J., Molina, C., Angles, A., Abilleira, S., Arenillas, J., Gonzalez, M.A., and Monasterio, J. (2001). Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. Stroke *32*, 1759-1766.
Moon, J.R., Capistrant, B.D., Kawachi, I., Avendano, M., Subramanian, S.V., Bates, L.M., and Glymour, M.M. (2012). Stroke incidence in older US Hispanics: is foreign birth protective? Stroke *43*, 1224-1229.
Mora, S., Cook, N., Buring, J.E., Ridker, P.M., and Lee, I.M. (2007). Physical activity and reduced risk of cardiovascular events: potential mediating mechanisms. Circulation *116*, 2110-2118.
Mori, T.A., and Woodman, R.J. (2006). The independent effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular risk factors in humans. Curr Opin Clin Nutr Metab Care *9*, 95-104.
Morris, M.C., Sacks, F., and Rosner, B. (1993). Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. Circulation *88*, 523-533.
Morris, R.C., Jr., Sebastian, A., Forman, A., Tanaka, M., and Schmidlin, O. (1999). Normotensive salt sensitivity: effects of race and dietary potassium. Hypertension *33*, 18-23.
Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., and O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature *297*, 681-683.
Moskowitz, M.A., Lo, E.H., and Iadecola, C. (2010). The science of stroke: mechanisms in search of treatments. Neuron *67*, 181-198.
Moulin, T., Tatu, L., Crepin-Leblond, T., Chavot, D., Berges, S., and Rumbach, T. (1997). The Besancon Stroke Registry: an acute stroke registry of 2,500 consecutive patients. Eur Neurol *38*, 10-20.
Mozaffarian, D. (2005). Does alpha-linolenic acid intake reduce the risk of coronary heart disease? A review of the evidence. Altern Ther Health Med *11*, 24-30; quiz 31, 79.
Mozaffarian, D., Longstreth, W.T., Jr., Lemaitre, R.N., Manolio, T.A., Kuller, L.H., Burke, G.L., and Siscovick, D.S. (2005). Fish consumption and stroke risk in elderly individuals: the cardiovascular health study. Arch Intern Med *165*, 200-206.
Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M.J., and Berger, S. (2008). General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in Arabidopsis. Plant Cell *20*, 768-785.
Muir, K.W., Lees, K.R., Ford, I., Davis, S., and Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke Study, I. (2004). Magnesium for acute stroke (Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke trial): randomised controlled trial. Lancet *363*, 439-445.
Mukherjee, P.K., Marcheselli, V.L., Serhan, C.N., and Bazan, N.G. (2004). Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 8491-8496.

Murakami, Y., Saito, K., Hara, A., Zhu, Y., Sudo, K., Niwa, M., Fujii, H., Wada, H., Ishiguro, H., Mori, H., *et al*. (2005). Increases in tumor necrosis factor-alpha following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus. J Neurochem *93*, 1616-1622.
Murphy, T.H., and Corbett, D. (2009). Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. Nature reviews Neuroscience *10*, 861-872.
Nagayama, M., Niwa, K., Nagayama, T., Ross, M.E., and Iadecola, C. (1999). The cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 ameliorates ischemic brain injury in wild-type mice but not in mice with deletion of the inducible nitric oxide synthase gene. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *19*, 1213-1219.
Namura, S., Zhu, J., Fink, K., Endres, M., Srinivasan, A., Tomaselli, K.J., Yuan, J., and Moskowitz, M.A. (1998). Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *18*, 3659-3668.
Narasimhalu, K., Ang, S., De Silva, D.A., Wong, M.C., Chang, H.M., Chia, K.S., Auchus, A.P., and Chen, C.P. (2011). The prognostic effects of poststroke cognitive impairment no dementia and domain-specific cognitive impairments in nondisabled ischemic stroke patients. Stroke *42*, 883-888.
Nathan, C., and Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. Cell *140*, 871-882.
Nawashiro, H., Martin, D., and Hallenbeck, J.M. (1997). Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *17*, 229-232.
Neuringer, M., Connor, W.E., Lin, D.S., Barstad, L., and Luck, S. (1986). Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *83*, 4021-4025.
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.
Nguemeni, C., Gouix, E., Bourourou, M., Heurteaux, C., and Blondeau, N. (2013). Alpha-linolenic acid: A promising nutraceutical for the prevention of stroke. In PharmaNutrition, pp. 1-8.
Nicholson, D.W., and Thornberry, N.A. (1997). Caspases: killer proteases. Trends Biochem Sci *22*, 299-306.
Nilupul Perera, M., Ma, H.K., Arakawa, S., Howells, D.W., Markus, R., Rowe, C.C., and Donnan, G.A. (2006). Inflammation following stroke. J Clin Neurosci *13*, 1-8.
Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. Science *308*, 1314-1318.
Nip, W.F., Perry, L., McLaren, S., and Mackenzie, A. (2011). Dietary intake, nutritional status and rehabilitation outcomes of stroke patients in hospital. J Hum Nutr Diet *24*, 460-469.
Nito, C., Ueda, M., Inaba, T., Katsura, K., and Katayama, Y. (2011). FK506 ameliorates oxidative damage and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia. Neurol Res *33*, 881-889.
Novak, T.E., Babcock, T.A., Jho, D.H., Helton, W.S., and Espat, N.J. (2003). NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol *284*, L84-89.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. Nature *307*, 462-465.
O'Collins, V.E., Macleod, M.R., Donnan, G.A., Horky, L.L., van der Worp, B.H., and Howells, D.W. (2006). 1,026 experimental treatments in acute stroke. Annals of neurology *59*, 467-477.
O'Donnell, M.J., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Chin, S.L., Rao-Melacini, P., Rangarajan, S., Islam, S., Pais, P., McQueen, M.J., *et al*. (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. Lancet *376*, 112-123.
O'Neill, L.A., and Kaltschmidt, C. (1997). NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. Trends Neurosci *20*, 252-258.
Offner, H., Subramanian, S., Parker, S.M., Afentoulis, M.E., Vandenbark, A.A., and Hurn, P.D. (2006). Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *26*, 654-665.
Ogden, C.L., Carroll, M.D., Kit, B.K., and Flegal, K.M. (2012). Prevalence of obesity in the United States, 2009-2010. NCHS Data Brief, 1-8.
Okabe, N., Nakamura, T., Toyoshima, T., Miyamoto, O., Lu, F., and Itano, T. (2011). Eicosapentaenoic acid prevents memory impairment after ischemia by inhibiting inflammatory response and oxidative damage. J Stroke Cerebrovasc Dis *20*, 188-195.
Okada, Y., Copeland, B.R., Fitridge, R., Koziol, J.A., and del Zoppo, G.J. (1994). Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. Stroke *25*, 1847-1853; discussion 1853-1844.
Olsen, T.S., Larsen, B., Herning, M., Skriver, E.B., and Lassen, N.A. (1983). Blood flow and vascular reactivity in collaterally perfused brain tissue. Evidence of an ischemic penumbra in patients with acute stroke. Stroke *14*, 332-341.
Orion, D., Schwammenthal, Y., Reshef, T., Schwartz, R., Tsabari, R., Merzeliak, O., Chapman, J., Mekori, Y.A., and Tanne, D. (2008). Interleukin-6 and soluble intercellular adhesion molecule-1 in acute brain ischaemia. European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies *15*, 323-328.
Ostendorf, C.G., and Wolf, S.L. (1981). Effect of forced use of the upper extremity of a hemiplegic patient on changes in function. A single-case design. Phys Ther *61*, 1022-1028.
Paravicini, T.M., Miller, A.A., Drummond, G.R., and Sobey, C.G. (2006). Flow-induced cerebral vasodilatation in vivo involves activation of phosphatidylinositol-3 kinase, NADPH-oxidase, and nitric oxide synthase. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *26*, 836-845.
Park, J., Choi, H., Min, J.S., Park, S.J., Kim, J.H., Park, H.J., Kim, B., Chae, J.I., Yim, M., and Lee, D.S. (2013). Mitochondrial dynamics modulate the expression of pro-inflammatory mediators in microglial cells. J Neurochem *127*, 221-232.
Parnetti, L., Amenta, F., and Gallai, V. (2001). Choline alphoscerate in cognitive decline and in acute cerebrovascular disease: an analysis of published clinical data. Mech Ageing Dev *122*, 2041-2055.
Paschen, W. (1996). Disturbances of calcium homeostasis within the endoplasmic reticulum may contribute to the development of ischemic-cell damage. Med Hypotheses *47*, 283-288.
Paschen, W. (2003). Shutdown of translation: lethal or protective? Unfolded protein response versus apoptosis. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *23*, 773-779.
Patel, A.R., Ritzel, R., McCullough, L.D., and Liu, F. (2013). Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol *5*, 73-90.

Pedersen, P.M., Jorgensen, H.S., Nakayama, H., Raaschou, H.O., and Olsen, T.S. (1995). Aphasia in acute stroke: incidence, determinants, and recovery. Annals of neurology *38*, 659-666.
Pekny, M., and Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. Glia *50*, 427-434.
Pettigrew, L.C., Kindy, M.S., Scheff, S., Springer, J.E., Kryscio, R.J., Li, Y., and Grass, D.S. (2008). Focal cerebral ischemia in the TNFalpha-transgenic rat. Journal of neuroinflammation *5*, 47.
Pirttila, T.R., and Kauppinen, R.A. (1992). Recovery of intracellular pH in cortical brain slices following anoxia studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy: role of lactate removal, extracellular sodium and sodium/hydrogen exchange. Neuroscience *47*, 155-164.
Planas, A.M., Soriano, M.A., Berruezo, M., Justicia, C., Estrada, A., Pitarch, S., and Ferrer, I. (1996). Induction of Stat3, a signal transducer and transcription factor, in reactive microglia following transient focal cerebral ischaemia. The European journal of neuroscience *8*, 2612-2618.
Plateel, M., Teissier, E., and Cecchelli, R. (1997). Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. J Neurochem *68*, 874-877.
Pollock, A., Baer, G., Campbell, P., Choo, P.L., Forster, A., Morris, J., Pomeroy, V.M., and Langhorne, P. (2014a). Physical rehabilitation approaches for the recovery of function and mobility following stroke. Cochrane Database Syst Rev *4*, CD001920.
Pollock, A., Baer, G., Pomeroy, V., and Langhorne, P. (2007). Physiotherapy treatment approaches for the recovery of postural control and lower limb function following stroke. Cochrane Database Syst Rev, CD001920.
Pollock, A., Farmer, S.E., Brady, M.C., Langhorne, P., Mead, G.E., Mehrholz, J., and van Wijck, F. (2014b). Interventions for improving upper limb function after stroke. Cochrane Database Syst Rev *11*, CD010820.
Pomeroy, V.M., King, L., Pollock, A., Baily-Hallam, A., and Langhorne, P. (2006). Electrostimulation for promoting recovery of movement or functional ability after stroke. Cochrane Database Syst Rev, CD003241.
Ponomarev, E.D., Veremeyko, T., and Weiner, H.L. (2013). MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. Glia *61*, 91-103.
Poudyal, H., Panchal, S.K., Diwan, V., and Brown, L. (2011). Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action. Progress in lipid research *50*, 372-387.
Powell, J., Pandyan, A.D., Granat, M., Cameron, M., and Stott, D.J. (1999). Electrical stimulation of wrist extensors in poststroke hemiplegia. Stroke *30*, 1384-1389.
Prospective Studies, C., Whitlock, G., Lewington, S., Sherliker, P., Clarke, R., Emberson, J., Halsey, J., Qizilbash, N., Collins, R., and Peto, R. (2009). Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. Lancet *373*, 1083-1096.
Psaty, B.M., Lumley, T., Furberg, C.D., Schellenbaum, G., Pahor, M., Alderman, M.H., and Weiss, N.S. (2003). Health outcomes associated with various antihypertensive therapies used as first-line agents: a network meta-analysis. JAMA *289*, 2534-2544.
Pudelkewicz, C., Seufert, J., and Holman, R.T. (1968). Requirements of the female rat for linoleic and linolenic acids. The Journal of nutrition *94*, 138-146.
Qin, X., Sun, Z.Q., Zhang, X.W., Dai, X.J., Mao, S.S., and Zhang, Y.M. (2013). TLR4 signaling is involved in the protective effect of propofol in BV2 microglia against OGD/reoxygenation. Journal of physiology and biochemistry *69*, 707-718.

Rabadi, M.H., Coar, P.L., Lukin, M., Lesser, M., and Blass, J.P. (2008). Intensive nutritional supplements can improve outcomes in stroke rehabilitation. Neurology *71*, 1856-1861.
Rabadi, M.H., and Kristal, B.S. (2007). Effect of vitamin C supplementation on stroke recovery: a case-control study. Clinical interventions in aging *2*, 147-151.
Raber, J., Fan, Y., Matsumori, Y., Liu, Z., Weinstein, P.R., Fike, J.R., and Liu, J. (2004). Irradiation attenuates neurogenesis and exacerbates ischemia-induced deficits. Annals of neurology *55*, 381-389.
Radak, Z., Zhao, Z., Goto, S., and Koltai, E. (2011). Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. Mol Aspects Med *32*, 305-315.
Rankin, J. (1957). Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60. I. General considerations. Scott Med J *2*, 127-136.
Ransohoff, R.M., and Brown, M.A. (2012). Innate immunity in the central nervous system. The Journal of clinical investigation *122*, 1164-1171.
Read, S.J., Hirano, T., Abbott, D.F., Sachinidis, J.I., Tochon-Danguy, H.J., Chan, J.G., Egan, G.F., Scott, A.M., Bladin, C.F., McKay, W.J., *et al*. (1998). Identifying hypoxic tissue after acute ischemic stroke using PET and 18F-fluoromisonidazole. Neurology *51*, 1617-1621.
Reis, J., Robertson, E., Krakauer, J.W., Rothwell, J., Marshall, L., Gerloff, C., Wassermann, E., Pascual-Leone, A., Hummel, F., Celnik, P.A., *et al*. (2008). Consensus: "Can tDCS and TMS enhance motor learning and memory formation?". Brain Stimul *1*, 363-369.
Reisbick, S., Neuringer, M., Gohl, E., Wald, R., and Anderson, G.J. (1997). Visual attention in infant monkeys: effects of dietary fatty acids and age. Dev Psychol *33*, 387-395.
Remington, L.T., Babcock, A.A., Zehntner, S.P., and Owens, T. (2007). Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination. Am J Pathol *170*, 1713-1724.
Reynolds, M.A., Kirchick, H.J., Dahlen, J.R., Anderberg, J.M., McPherson, P.H., Nakamura, K.K., Laskowitz, D.T., Valkirs, G.E., and Buechler, K.F. (2003). Early biomarkers of stroke. Clin Chem *49*, 1733-1739.
Richards, C.L., Malouin, F., and Dean, C. (1999). Gait in stroke: assessment and rehabilitation. Clin Geriatr Med *15*, 833-855.
Ridder, D.A., Bulashevska, S., Chaitanya, G.V., Babu, P.P., Brors, B., Eils, R., Schneider, A., and Schwaninger, M. (2009). Discovery of transcriptional programs in cerebral ischemia by in silico promoter analysis. Brain research *1272*, 3-13.
Ridnour, L.A., Thomas, D.D., Mancardi, D., Espey, M.G., Miranda, K.M., Paolocci, N., Feelisch, M., Fukuto, J., and Wink, D.A. (2004). The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. Biol Chem *385*, 1-10.
Ringman, J.M., Saver, J.L., Woolson, R.F., Clarke, W.R., and Adams, H.P. (2004). Frequency, risk factors, anatomy, and course of unilateral neglect in an acute stroke cohort. Neurology *63*, 468-474.
Robinson, R.G. (2003). Poststroke depression: prevalence, diagnosis, treatment, and disease progression. Biological psychiatry *54*, 376-387.
Ronning, O.M., and Guldvog, B. (1998). Stroke units versus general medical wards, I: twelve- and eighteen-month survival: a randomized, controlled trial. Stroke *29*, 58-62.
Rosamond, W.D., Folsom, A.R., Chambless, L.E., Wang, C.H., McGovern, P.G., Howard, G., Copper, L.S., and Shahar, E. (1999). Stroke incidence and survival among middle-aged adults: 9-year follow-up of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) cohort. Stroke *30*, 736-743.
Rosell, A., Cuadrado, E., Ortega-Aznar, A., Hernandez-Guillamon, M., Lo, E.H., and Montaner, J. (2008). MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain

barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. Stroke *39*, 1121-1126.
Rossi, D.J., Oshima, T., and Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. Nature *403*, 316-321.
Ruscher, K., Isaev, N., Trendelenburg, G., Weih, M., Iurato, L., Meisel, A., and Dirnagl, U. (1998). Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. Neurosci Lett *254*, 117-120.
Saas, P., Boucraut, J., Walker, P.R., Quiquerez, A.L., Billot, M., Desplat-Jego, S., Chicheportiche, Y., and Dietrich, P.Y. (2000). TWEAK stimulation of astrocytes and the proinflammatory consequences. Glia *32*, 102-107.
Sacco, R.L., Boden-Albala, B., Gan, R., Chen, X., Kargman, D.E., Shea, S., Paik, M.C., and Hauser, W.A. (1998a). Stroke incidence among white, black, and Hispanic residents of an urban community: the Northern Manhattan Stroke Study. Am J Epidemiol *147*, 259-268.
Sacco, R.L., Gan, R., Boden-Albala, B., Lin, I.F., Kargman, D.E., Hauser, W.A., Shea, S., and Paik, M.C. (1998b). Leisure-time physical activity and ischemic stroke risk: the Northern Manhattan Stroke Study. Stroke *29*, 380-387.
Sacco, R.L., Kasner, S.E., Broderick, J.P., Caplan, L.R., Connors, J.J., Culebras, A., Elkind, M.S., George, M.G., Hamdan, A.D., Higashida, R.T., *et al*. (2013). An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke *44*, 2064-2089.
Sacks, F.M., Svetkey, L.P., Vollmer, W.M., Appel, L.J., Bray, G.A., Harsha, D., Obarzanek, E., Conlin, P.R., Miller, E.R., 3rd, Simons-Morton, D.G., *et al*. (2001). Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. N Engl J Med *344*, 3-10.
Sairanen, T., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Paetau, A., Ijas, P., and Lindsberg, P.J. (2006). Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke--a possible target of antiapoptotic treatments. Brain : a journal of neurology *129*, 189-199.
Saleem, S., Zhuang, H., de Brum-Fernandes, A.J., Maruyama, T., Narumiya, S., and Dore, S. (2007). PGD(2) DP1 receptor protects brain from ischemia-reperfusion injury. The European journal of neuroscience *26*, 73-78.
Sampath, H., and Ntambi, J.M. (2005). Polyunsaturated fatty acid regulation of genes of lipid metabolism. Annual review of nutrition *25*, 317-340.
Sanai, N., Tramontin, A.D., Quinones-Hinojosa, A., Barbaro, N.M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M.T., McDermott, M.W., Parsa, A.T., Manuel-Garcia Verdugo, J., *et al*. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. Nature *427*, 740-744.
Sanchez-Moreno, C., Dashe, J.F., Scott, T., Thaler, D., Folstein, M.F., and Martin, A. (2004). Decreased levels of plasma vitamin C and increased concentrations of inflammatory and oxidative stress markers after stroke. Stroke *35*, 163-168.
Sandoval, K.E., and Witt, K.A. (2008). Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. Neurobiol Dis *32*, 200-219.
Sato, Y., Iwamoto, J., Kanoko, T., and Satoh, K. (2005). Low-dose vitamin D prevents muscular atrophy and reduces falls and hip fractures in women after stroke: a randomized controlled trial. Cerebrovascular diseases *20*, 187-192.
Saver, J.L. (2006). Time is brain--quantified. Stroke *37*, 263-266.
Scalzo, F., Nour, M., and Liebeskind, D.S. (2015). Data science of stroke imaging and enlightenment of the penumbra. Front Neurol *6*, 8.
Schaller, B. (2007). State-of-the-art imaging in stroke (New York: Nova Biomedical Books).
Scherbakov, N., Dirnagl, U., and Doehner, W. (2011). Body weight after stroke: lessons from the obesity paradox. Stroke *42*, 3646-3650.

Schilling, M., Strecker, J.K., Schabitz, W.R., Ringelstein, E.B., and Kiefer, R. (2009). Effects of monocyte chemoattractant protein 1 on blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. Neuroscience *161*, 806-812.
Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S.E., Pollard, J.W., *et al*. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. Science *336*, 86-90.
Selman, W.R., Crumrine, R.C., Ricci, A.J., LaManna, J.C., Ratcheson, R.A., and Lust, W.D. (1990). Impairment of metabolic recovery with increasing periods of middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke *21*, 467-471.
Serhan, C.N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. Nature *510*, 92-101.
Serhan, C.N., Clish, C.B., Brannon, J., Colgan, S.P., Chiang, N., and Gronert, K. (2000). Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. J Exp Med *192*, 1197-1204.
Services, U.D.o.H.a.H. (2008). Physical activity guidelines for Americans. Okla Nurse *53*, 25.
Shang, Y.C., Chong, Z.Z., Hou, J., and Maiese, K. (2009). FoxO3a governs early microglial proliferation and employs mitochondrial depolarization with caspase 3, 8, and 9 cleavage during oxidant induced apoptosis. Curr Neurovasc Res *6*, 223-238.
Shimizu-Sasamata, M., Kano, T., Rogowska, J., Wolf, G.L., Moskowitz, M.A., and Lo, E.H. (1998). YM872, a highly water-soluble AMPA receptor antagonist, preserves the hemodynamic penumbra and reduces brain injury after permanent focal ischemia in rats. Stroke *29*, 2141-2148.
Shimokawa, H., and Vanhoutte, P.M. (1989). Dietary omega 3 fatty acids and endothelium-dependent relaxations in porcine coronary arteries. Am J Physiol *256*, H968-973.
Shin, W.H., Lee, D.Y., Park, K.W., Kim, S.U., Yang, M.S., Joe, E.H., and Jin, B.K. (2004). Microglia expressing interleukin-13 undergo cell death and contribute to neuronal survival in vivo. Glia *46*, 142-152.
Shuaib, A., Lees, K.R., Lyden, P., Grotta, J., Davalos, A., Davis, S.M., Diener, H.C., Ashwood, T., Wasiewski, W.W., Emeribe, U., *et al*. (2007). NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. N Engl J Med *357*, 562-571.
Siao, C.J., and Tsirka, S.E. (2002). Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience *22*, 3352-3358.
Simi, A., Tsakiri, N., Wang, P., and Rothwell, N.J. (2007). Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. Biochem Soc Trans *35*, 1122-1126.
Simopoulos, A.P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. In Exp Biol Med (Maywood), pp. 674-688.
Smith, J.A., Park, S., Krause, J.S., and Banik, N.L. (2013). Oxidative stress, DNA damage, and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. Neurochemistry international *62*, 764-775.
Smithard, D.G., Smeeton, N.C., and Wolfe, C.D. (2007). Long-term outcome after stroke: does dysphagia matter? Age Ageing *36*, 90-94.
Soriano, S.G., Amaravadi, L.S., Wang, Y.F., Zhou, H., Yu, G.X., Tonra, J.R., Fairchild-Huntress, V., Fang, Q., Dunmore, J.H., Huszar, D., *et al*. (2002). Mice deficient in fractalkine are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. Journal of neuroimmunology *125*, 59-65.
Spite, M., and Serhan, C.N. (2010). Novel lipid mediators promote resolution of acute inflammation: impact of aspirin and statins. Circulation research *107*, 1170-1184.

Squire, L.R., and Zola, S.M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *93*, 13515-13522.
Stamatovic, S.M., Shakui, P., Keep, R.F., Moore, B.B., Kunkel, S.L., Van Rooijen, N., and Andjelkovic, A.V. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *25*, 593-606.
Stanley, J.C., Elsom, R.L., Calder, P.C., Griffin, B.A., Harris, W.S., Jebb, S.A., Lovegrove, J.A., Moore, C.S., Riemersma, R.A., and Sanders, T.A. (2007). UK Food Standards Agency Workshop Report: the effects of the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio on cardiovascular health. The British journal of nutrition *98*, 1305-1310.
Starossom, S.C., Mascanfroni, I.D., Imitola, J., Cao, L., Raddassi, K., Hernandez, S.F., Bassil, R., Croci, D.O., Cerliani, J.P., Delacour, D., *et al*. (2012). Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. Immunity *37*, 249-263.
Stowe, A.M., Wacker, B.K., Cravens, P.D., Perfater, J.L., Li, M.K., Hu, R., Freie, A.B., Stuve, O., and Gidday, J.M. (2012). CCL2 upregulation triggers hypoxic preconditioning-induced protection from stroke. Journal of neuroinflammation *9*, 33.
Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. Nat Rev Immunol *5*, 189-200.
Stroke Unit Trialists, C. (2013). Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. Cochrane Database Syst Rev *9*, CD000197.
Strong, K., Mathers, C., and Bonita, R. (2007). Preventing stroke: saving lives around the world. The Lancet Neurology *6*, 182-187.
Studer, M., Briel, M., Leimenstoll, B., Glass, T.R., and Bucher, H.C. (2005). Effect of different antilipidemic agents and diets on mortality: a systematic review. Arch Intern Med *165*, 725-730.
Sui, X., Lavie, C.J., Hooker, S.P., Lee, D.C., Colabianchi, N., Lee, C.D., and Blair, S.N. (2011). A prospective study of fasting plasma glucose and risk of stroke in asymptomatic men. Mayo Clin Proc *86*, 1042-1049.
Suk, S.H., Sacco, R.L., Boden-Albala, B., Cheun, J.F., Pittman, J.G., Elkind, M.S., Paik, M.C., and Northern Manhattan Stroke, S. (2003). Abdominal obesity and risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Stroke Study. Stroke *34*, 1586-1592.
Susser, E., Neugebauer, R., Hoek, H.W., Brown, A.S., Lin, S., Labovitz, D., and Gorman, J.M. (1996). Schizophrenia after prenatal famine. Further evidence. Arch Gen Psychiatry *53*, 25-31.
Suzuki, H., Hayashi, T., Tojo, S.J., Kitagawa, H., Kimura, K., Mizugaki, M., Itoyama, Y., and Abe, K. (1999a). Anti-P-selectin antibody attenuates rat brain ischemic injury. Neurosci Lett *265*, 163-166.
Suzuki, S., Tanaka, K., Nogawa, S., Nagata, E., Ito, D., Dembo, T., and Fukuuchi, Y. (1999b). Temporal profile and cellular localization of interleukin-6 protein after focal cerebral ischemia in rats. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *19*, 1256-1262.
Suzuki, S., Tanaka, K., and Suzuki, N. (2009). Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *29*, 464-479.
Tagawa, T., Hirooka, Y., Shimokawa, H., Hironaga, K., Sakai, K., Oyama, J., and Takeshita, A. (2002). Long-term treatment with eicosapentaenoic acid improves exercise-induced vasodilation in patients with coronary artery disease. Hypertens Res *25*, 823-829.

Takeuchi, N., Tada, T., Toshima, M., Chuma, T., Matsuo, Y., and Ikoma, K. (2008). Inhibition of the unaffected motor cortex by 1 Hz repetitive transcranical magnetic stimulation enhances motor performance and training effect of the paretic hand in patients with chronic stroke. J Rehabil Med *40*, 298-303.
Tarozzo, G., Campanella, M., Ghiani, M., Bulfone, A., and Beltramo, M. (2002). Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in response to ischaemia-reperfusion brain injury in the rat. The European journal of neuroscience *15*, 1663-1668.
Tatemichi, T.K., Desmond, D.W., Stern, Y., Paik, M., Sano, M., and Bagiella, E. (1994). Cognitive impairment after stroke: frequency, patterns, and relationship to functional abilities. J Neurol Neurosurg Psychiatry *57*, 202-207.
Taub, E., Uswatte, G., King, D.K., Morris, D., Crago, J.E., and Chatterjee, A. (2006). A placebo-controlled trial of constraint-induced movement therapy for upper extremity after stroke. Stroke *37*, 1045-1049.
Taylor, A., Verhagen, J., Blaser, K., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2006). Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. Immunology *117*, 433-442.
Taylor, R.A., and Sansing, L.H. (2013). Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. Clin Dev Immunol *2013*, 746068.
Terao, S., Yilmaz, G., Stokes, K.Y., Ishikawa, M., Kawase, T., and Granger, D.N. (2008). Inflammatory and injury responses to ischemic stroke in obese mice. Stroke *39*, 943-950.
Thomas, S.A., and Lincoln, N.B. (2008). Predictors of emotional distress after stroke. Stroke *39*, 1240-1245.
Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. Science *281*, 1312-1316.
Thun, M.J., Apicella, L.F., and Henley, S.J. (2000). Smoking vs other risk factors as the cause of smoking-attributable deaths: confounding in the courtroom. JAMA *284*, 706-712.
Tong, D.C., Yenari, M.A., Albers, G.W., O'Brien, M., Marks, M.P., and Moseley, M.E. (1998). Correlation of perfusion- and diffusion-weighted MRI with NIHSS score in acute (<6.5 hour) ischemic stroke. Neurology *50*, 864-870.
Topol, E.J., Easton, D., Harrington, R.A., Amarenco, P., Califf, R.M., Graffagnino, C., Davis, S., Diener, H.C., Ferguson, J., Fitzgerald, D., *et al*. (2003). Randomized, double-blind, placebo-controlled, international trial of the oral IIb/IIIa antagonist lotrafiban in coronary and cerebrovascular disease. Circulation *108*, 399-406.
Toss, F., Wiklund, P., Franks, P.W., Eriksson, M., Gustafson, Y., Hallmans, G., Nordstrom, P., and Nordstrom, A. (2011). Abdominal and gynoid adiposity and the risk of stroke. International journal of obesity *35*, 1427-1432.
Trebble, T., Arden, N.K., Stroud, M.A., Wootton, S.A., Burdge, G.C., Miles, E.A., Ballinger, A.B., Thompson, R.L., and Calder, P.C. (2003). Inhibition of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 6 production by mononuclear cells following dietary fish-oil supplementation in healthy men and response to antioxidant co-supplementation. The British journal of nutrition *90*, 405-412.
Trenkwalder, P. (2000). Reducing cardiovascular morbidity and mortality in the elderly. Blood Press Suppl *1*, 40-43.
Trojaborg, W., and Boysen, G. (1973). Relation between EEG, regional cerebral blood flow and internal carotid artery pressure during carotid endarterectomy. Electroencephalogr Clin Neurophysiol *34*, 61-69.
Uno, H., Matsuyama, T., Akita, H., Nishimura, H., and Sugita, M. (1997). Induction of tumor necrosis factor-alpha in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *17*, 491-499.

Valtysson, J., Hillered, L., Andine, P., Hagberg, H., and Persson, L. (1994). Neuropathological endpoints in experimental stroke pharmacotherapy: the importance of both early and late evaluation. Acta neurochirurgica *129*, 58-63.
van de Port, I.G., Wood-Dauphinee, S., Lindeman, E., and Kwakkel, G. (2007). Effects of exercise training programs on walking competency after stroke: a systematic review. Am J Phys Med Rehabil *86*, 935-951.
van der Worp, H.B., Sena, E.S., Donnan, G.A., Howells, D.W., and Macleod, M.R. (2007). Hypothermia in animal models of acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis. Brain : a journal of neurology *130*, 3063-3074.
van Leyen, K., Duvoisin, R.M., Engelhardt, H., and Wiedmann, M. (1998). A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. Nature *395*, 392-395.
van Leyen, K., Kim, H.Y., Lee, S.R., Jin, G., Arai, K., and Lo, E.H. (2006). Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. Stroke *37*, 3014-3018.
van Overbeek, E.C., Staals, J., and van Oostenbrugge, R.J. (2013). Vitamin B12 and progression of white matter lesions. A 2-year follow-up study in first-ever lacunar stroke patients. PloS one *8*, e78100.
Vatassery, G.T. (1998). Vitamin E and other endogenous antioxidants in the central nervous system. Geriatrics *53 Suppl 1*, S25-27.
Veerbeek, J.M., van Wegen, E., van Peppen, R., van der Wees, P.J., Hendriks, E., Rietberg, M., and Kwakkel, G. (2014). What is the evidence for physical therapy poststroke? A systematic review and meta-analysis. PloS one *9*, e87987.
Venna, V.R., Deplanque, D., Allet, C., Belarbi, K., Hamdane, M., and Bordet, R. (2009). PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. Psychoneuroendocrinology *34*, 199-211.
Vinton, N.E., Heckenlively, J.R., Laidlaw, S.A., Martin, D.A., Foxman, S.R., Ament, M.E., and Kopple, J.D. (1990). Visual function in patients undergoing long-term total parenteral nutrition. The American journal of clinical nutrition *52*, 895-902.
Vojtek, A.B., Taylor, J., DeRuiter, S.L., Yu, J.Y., Figueroa, C., Kwok, R.P., and Turner, D.L. (2003). Akt regulates basic helix-loop-helix transcription factor-coactivator complex formation and activity during neuronal differentiation. Mol Cell Biol *23*, 4417-4427.
von Schacky, C., Kiefl, R., Jendraschak, E., and Kaminski, W.E. (1993). n-3 fatty acids and cysteinyl-leukotriene formation in humans in vitro, ex vivo, and in vivo. J Lab Clin Med *121*, 302-309.
Wacker, B.K., Perfater, J.L., and Gidday, J.M. (2012). Hypoxic preconditioning induces stroke tolerance in mice via a cascading HIF, sphingosine kinase, and CCL2 signaling pathway. J Neurochem *123*, 954-962.
Wallace, F.A., Miles, E.A., and Calder, P.C. (2003). Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. The British journal of nutrition *89*, 679-689.
Wang, C., Harris, W.S., Chung, M., Lichtenstein, A.H., Balk, E.M., Kupelnick, B., Jordan, H.S., and Lau, J. (2006). n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. The American journal of clinical nutrition *84*, 5-17.
Wang, J., Zhang, X., Mu, L., Zhang, M., Gao, Z., Zhang, J., Yao, X., Liu, C., Wang, G., Wang, D., *et al*. (2014). t-PA acts as a cytokine to regulate lymphocyte-endothelium adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis. Clin Immunol *152*, 90-100.
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, X., and Feuerstein, G.Z. (1995). Induced expression of adhesion molecules following focal brain ischemia. J Neurotrauma *12*, 825-832.
Wang, X., Lee, S.R., Arai, K., Lee, S.R., Tsuji, K., Rebeck, G.W., and Lo, E.H. (2003). Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. Nature medicine *9*, 1313-1317.
Wang, X., Yue, T.L., Young, P.R., Barone, F.C., and Feuerstein, G.Z. (1995). Expression of interleukin-6, c-fos, and zif268 mRNAs in rat ischemic cortex. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *15*, 166-171.
Wang, Y., Chiang, Y.H., Su, T.P., Hayashi, T., Morales, M., Hoffer, B.J., and Lin, S.Z. (2000). Vitamin D(3) attenuates cortical infarction induced by middle cerebral arterial ligation in rats. Neuropharmacology *39*, 873-880.
Warach, S., Pettigrew, L.C., Dashe, J.F., Pullicino, P., Lefkowitz, D.M., Sabounjian, L., Harnett, K., Schwiderski, U., and Gammans, R. (2000). Effect of citicoline on ischemic lesions as measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. Citicoline 010 Investigators. Annals of neurology *48*, 713-722.
Ward, P., Seri, and Cavanna, A.E. (2012). Functional neuroanatomy and behavioural correlates of the basal ganglia: evidence from lesion studies. Behav Neurol *26*, 219-223.
Watanabe, H., Abe, H., Takeuchi, S., and Tanaka, R. (2000). Protective effect of microglial conditioning medium on neuronal damage induced by glutamate. Neurosci Lett *289*, 53-56.
Webster, B.R., Celnik, P.A., and Cohen, L.G. (2006). Noninvasive brain stimulation in stroke rehabilitation. NeuroRx *3*, 474-481.
Weinstein, J.R., Koerner, I.P., and Moller, T. (2010). Microglia in ischemic brain injury. Future Neurol *5*, 227-246.
Weinstein, P.R., Anderson, G.G., and Telles, D.A. (1986). Neurological deficit and cerebral infarction after temporary middle cerebral artery occlusion in unanesthetized cats. Stroke *17*, 318-324.
Westergren, A., Karlsson, S., Andersson, P., Ohlsson, O., and Hallberg, I.R. (2001). Eating difficulties, need for assisted eating, nutritional status and pressure ulcers in patients admitted for stroke rehabilitation. J Clin Nurs *10*, 257-269.
Westermaier, T., Stetter, C., Kunze, E., Willner, N., Raslan, F., Vince, G.H., and Ernestus, R.I. (2013). Magnesium treatment for neuroprotection in ischemic diseases of the brain. Experimental & translational stroke medicine *5*, 6.
Whelton, P.K., He, J., Appel, L.J., Cutler, J.A., Havas, S., Kotchen, T.A., Roccella, E.J., Stout, R., Vallbona, C., Winston, M.C., *et al*. (2002). Primary prevention of hypertension: clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program. JAMA *288*, 1882-1888.
Whelton, P.K., He, J., Cutler, J.A., Brancati, F.L., Appel, L.J., Follmann, D., and Klag, M.J. (1997). Effects of oral potassium on blood pressure. Meta-analysis of randomized controlled clinical trials. JAMA *277*, 1624-1632.
Whiteley, W., Jackson, C., Lewis, S., Lowe, G., Rumley, A., Sandercock, P., Wardlaw, J., Dennis, M., and Sudlow, C. (2009). Inflammatory markers and poor outcome after stroke: a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6. PLoS Med *6*, e1000145.
Wildman, R.P., McGinn, A.P., Lin, J., Wang, D., Muntner, P., Cohen, H.W., Reynolds, K., Fonseca, V., and Sowers, M.R. (2011). Cardiovascular disease risk of abdominal obesity vs. metabolic abnormalities. Obesity (Silver Spring) *19*, 853-860.
Willett, W.C. (2011). The great fat debate: total fat and health. Journal of the American Dietetic Association *111*, 660-662.

Wilson, P.W., Bozeman, S.R., Burton, T.M., Hoaglin, D.C., Ben-Joseph, R., and Pashos, C.L. (2008). Prediction of first events of coronary heart disease and stroke with consideration of adiposity. Circulation *118*, 124-130.
Winnik, S., Lohmann, C., Richter, E.K., Schafer, N., Song, W.L., Leiber, F., Mocharla, P., Hofmann, J., Klingenberg, R., Boren, J., *et al*. (2011). Dietary alpha-linolenic acid diminishes experimental atherogenesis and restricts T cell-driven inflammation. European heart journal *32*, 2573-2584.
Wisse, B.E., Ogimoto, K., Tang, J., Harris, M.K., Jr., Raines, E.W., and Schwartz, M.W. (2007). Evidence that lipopolysaccharide-induced anorexia depends upon central, rather than peripheral, inflammatory signals. Endocrinology *148*, 5230-5237.
Wolf, P.A., D'Agostino, R.B., Kannel, W.B., Bonita, R., and Belanger, A.J. (1988). Cigarette smoking as a risk factor for stroke. The Framingham Study. JAMA *259*, 1025-1029.
Won, S., Lee, J.K., and Stein, D.G. (2015). Recombinant tissue plasminogen activator promotes, and progesterone attenuates, microglia/macrophage M1 polarization and recruitment of microglia after MCAO stroke in rats. Brain, behavior, and immunity *49*, 267-279.
World Health Organization (1995). WHO and FAO joint consultation: fats and oils in human nutrition. Nutr Rev *53*, 202-205.
Xian, W., Wu, Y., Xiong, W., Li, L., Li, T., Pan, S., Song, L., Hu, L., Pei, L., Yao, S., *et al*. (2016). The pro-resolving lipid mediator Maresin 1 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by attenuating the pro-inflammatory response. Biochem Biophys Res Commun *472*, 175-181.
Yamasaki, Y., Matsuo, Y., Matsuura, N., Onodera, H., Itoyama, Y., and Kogure, K. (1995a). Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats. Stroke *26*, 318-322; discussion 322-313.
Yamasaki, Y., Matsuo, Y., Zagorski, J., Matsuura, N., Onodera, H., Itoyama, Y., and Kogure, K. (1997). New therapeutic possibility of blocking cytokine-induced neutrophil chemoattractant on transient ischemic brain damage in rats. Brain research *759*, 103-111.
Yamasaki, Y., Matsuura, N., Shozuhara, H., Onodera, H., Itoyama, Y., and Kogure, K. (1995b). Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. Stroke *26*, 676-680; discussion 681.
Yamasaki, Y., Shozuhara, H., Onodera, H., and Kogure, K. (1994). Blocking of interleukin-1 activity is a beneficial approach to ischemia brain edema formation. Acta Neurochir Suppl (Wien) *60*, 300-302.
Yamashita, T., Sawamoto, K., Suzuki, S., Suzuki, N., Adachi, K., Kawase, T., Mihara, M., Ohsugi, Y., Abe, K., and Okano, H. (2005). Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of Stat3 activation in the protection of neurons. J Neurochem *94*, 459-468.
Yan, Y.P., Sailor, K.A., Lang, B.T., Park, S.W., Vemuganti, R., and Dempsey, R.J. (2007). Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *27*, 1213-1224.
Yang, G.Y., Gong, C., Qin, Z., Ye, W., Mao, Y., and Bertz, A.L. (1998). Inhibition of TNFalpha attenuates infarct volume and ICAM-1 expression in ischemic mouse brain. Neuroreport *9*, 2131-2134.
Yao, Y., and Tsirka, S.E. (2011). Truncation of monocyte chemoattractant protein 1 by plasmin promotes blood-brain barrier disruption. J Cell Sci *124*, 1486-1495.

Yepes, M., Brown, S.A., Moore, E.G., Smith, E.P., Lawrence, D.A., and Winkles, J.A. (2005). A soluble Fn14-Fc decoy receptor reduces infarct volume in a murine model of cerebral ischemia. Am J Pathol *166*, 511-520.
Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E.G., Bugge, T.H., Strickland, D.K., and Lawrence, D.A. (2003). Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. The Journal of clinical investigation *112*, 1533-1540.
Yilmaz, G., and Granger, D.N. (2008). Cell adhesion molecules and ischemic stroke. Neurol Res *30*, 783-793.
Yilmaz, G., and Granger, D.N. (2010). Leukocyte recruitment and ischemic brain injury. Neuromolecular medicine *12*, 193-204.
Yiu, G., and He, Z. (2006). Glial inhibition of CNS axon regeneration. Nature reviews Neuroscience *7*, 617-627.
Yokoyama, M., Origasa, H., Matsuzaki, M., Matsuzawa, Y., Saito, Y., Ishikawa, Y., Oikawa, S., Sasaki, J., Hishida, H., Itakura, H., *et al*. (2007). Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. Lancet *369*, 1090-1098.
Yoo, S.H., Kim, J.S., Kwon, S.U., Yun, S.C., Koh, J.Y., and Kang, D.W. (2008). Undernutrition as a predictor of poor clinical outcomes in acute ischemic stroke patients. Arch Neurol *65*, 39-43.
Yoon, T.H., Han, S.J., Yoon, T.S., Kim, J.S., and Yi, T.I. (2015). Therapeutic effect of repetitive magnetic stimulation combined with speech and language therapy in post-stroke non-fluent aphasia. NeuroRehabilitation *36*, 107-114.
Yoshimura, T., Robinson, E.A., Tanaka, S., Appella, E., and Leonard, E.J. (1989a). Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. J Immunol *142*, 1956-1962.
Yoshimura, T., Yuhki, N., Moore, S.K., Appella, E., Lerman, M.I., and Leonard, E.J. (1989b). Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. FEBS Lett *244*, 487-493.
Yrjanheikki, J., Keinanen, R., Pellikka, M., Hokfelt, T., and Koistinaho, J. (1998). Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *95*, 15769-15774.
Yrjanheikki, J., Tikka, T., Keinanen, R., Goldsteins, G., Chan, P.H., and Koistinaho, J. (1999). A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *96*, 13496-13500.
Yu, S.P., Yeh, C.H., Sensi, S.L., Gwag, B.J., Canzoniero, L.M., Farhangrazi, Z.S., Ying, H.S., Tian, M., Dugan, L.L., and Choi, D.W. (1997). Mediation of neuronal apoptosis by enhancement of outward potassium current. Science *278*, 114-117.
Zanette, E.M., Fieschi, C., Bozzao, L., Roberti, C., Toni, D., Argentino, C., and Lenzi, G.L. (1989). Comparison of cerebral angiography and transcranial Doppler sonography in acute stroke. Stroke *20*, 899-903.
Zaremba, J., Skrobanski, P., and Losy, J. (2001). Tumour necrosis factor-alpha is increased in the cerebrospinal fluid and serum of ischaemic stroke patients and correlates with the volume of evolving brain infarct. Biomed Pharmacother *55*, 258-263.
Zhang, J., Barasch, N., Li, R.C., and Sapirstein, A. (2012). Inhibition of cytosolic phospholipase A(2) alpha protects against focal ischemic brain damage in mice. Brain research *1471*, 129-137.

Zhang, N., Komine-Kobayashi, M., Tanaka, R., Liu, M., Mizuno, Y., and Urabe, T. (2005). Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain. Stroke *36*, 2220-2225.
Zhang, R., Chopp, M., Zhang, Z., Jiang, N., and Powers, C. (1998a). The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion. Brain research *785*, 207-214.
Zhang, R.L., Chopp, M., Jiang, N., Tang, W.X., Prostak, J., Manning, A.M., and Anderson, D.C. (1995). Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. Stroke *26*, 1438-1442; discussion 1443.
Zhang, R.L., Zhang, Z.G., and Chopp, M. (2008). Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. Neuropharmacology *55*, 345-352.
Zhang, R.L., Zhang, Z.G., Zhang, L., and Chopp, M. (2001). Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia. Neuroscience *105*, 33-41.
Zhang, W., Hu, X., Yang, W., Gao, Y., and Chen, J. (2010). Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation confers long-term neuroprotection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury through anti-inflammatory actions. Stroke *41*, 2341-2347.
Zhang, Z., Chopp, M., Goussev, A., and Powers, C. (1998b). Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia. Brain research *784*, 210-217.
Zhang, Z., Chopp, M., and Powers, C. (1997). Temporal profile of microglial response following transient (2 h) middle cerebral artery occlusion. Brain research *744*, 189-198.
Zhang, Z.G., Zhang, L., Tsang, W., Soltanian-Zadeh, H., Morris, D., Zhang, R., Goussev, A., Powers, C., Yeich, T., and Chopp, M. (2002). Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism *22*, 379-392.
Zhao, G., Etherton, T.D., Martin, K.R., Gillies, P.J., West, S.G., and Kris-Etherton, P.M. (2007). Dietary alpha-linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. The American journal of clinical nutrition *85*, 385-391.
Zhao, G., Etherton, T.D., Martin, K.R., Vanden Heuvel, J.P., Gillies, P.J., West, S.G., and Kris-Etherton, P.M. (2005). Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. Biochem Biophys Res Commun *336*, 909-917.
Zhao, G., Etherton, T.D., Martin, K.R., West, S.G., Gillies, P.J., and Kris-Etherton, P.M. (2004). Dietary alpha-linolenic acid reduces inflammatory and lipid cardiovascular risk factors in hypercholesterolemic men and women. The Journal of nutrition *134*, 2991-2997.
Zhou, X., Spittau, B., and Krieglstein, K. (2012). TGFbeta signalling plays an important role in IL4-induced alternative activation of microglia. Journal of neuroinflammation *9*, 210.
Zong, W.X., and Thompson, C.B. (2006). Necrotic death as a cell fate. Genes Dev *20*, 1-15.

Annexes

PharmaNutrition 1 (2013) 1–8

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

PharmaNutrition

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phanu

Review

Alpha-linolenic acid: A promising nutraceutical for the prevention of stroke

Carine Nguemeni [a,b], Elsa Gouix [a,b], Miled Bourourou [a,b], Catherine Heurteaux [a,b], Nicolas Blondeau [a,b,*]

[a] Institut de Pharmacologie Moléculaires et Cellulaires, UMR7275, C.N.R.S, 06560 Valbonne, France
[b] Université de Nice Sophia Antipolis, 28, Avenue de Valrose, Nice Cedex 2, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 November 2012
Received in revised form 29 December 2012
Accepted 29 December 2012

Keywords:
Ischemic stroke
Neuroprotection
Omega-3 polyunsaturated fatty acid
Alpha-linolenic acid
Nutraceutical
Enriched diet

ABSTRACT

Stroke is a worldwide main cause of mortality and morbidity. Most of the preventive and neuroprotective treatments identified in preclinical studies failed in clinical trials. Although there is a consensus that nutrition is important for health, its role is underestimated in stroke. Indeed an increase consumption of salt and fatty foods may promote hypertension and obesity, which are well known risk factors of stroke. In contrast it is more difficult to identify a risk factor arising from a deficiency in an essential nutrient in the diet. Western modern diets are deficient in omega-3 polyunsaturated fatty acids, which are essential for brain health. Such deficiency may constitute by itself a risk factor for stroke. Furthermore, an imbalance in the consumption of omega-6 and omega-3 progressively took place in the past 40 years leading to omega-6/omega-3 ratios that are far above the WHO healthy recommendations. A consequence of this imbalanced ratio has been the fostering of elevations in and increased prevalence of inflammatory cardiovascular diseases and obesity. In this context, this review outlines a promising therapeutic opportunity by integrating a nutritional-based approach focusing on omega-3 alpha-linolenic acid as nutraceutical to prevent the devastating damage caused by brain ischemia.
© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction . . . 2
2. Stroke statistics and healthcare . . . 2
   2.1. Stroke statistics . . . 2
   2.2. Stroke physiopathology . . . 2
   2.3. Stroke, risk factors and nutrition . . . 3
3. Why the polyunsaturation matter in omega-6 and omega-3 . . . 4
   3.1. Omega-6/omega-3 structure . . . 4
   3.2. The omega-3 family: DHA and EPA versus ALA supplementation . . . 5
   3.3. Beneficial effects of ALA: the origin of the concept . . . 5
4. ALA and stroke . . . 5
   4.1. ALA and the neurovascular unit . . . 6
   4.2. ALA in an experimental model of focal ischemic stroke . . . 6
   4.3. ALA supplementation, synaptogenesis and neurogenesis . . . 6
   4.4. Dietary ALA against stroke . . . 6
5. Conclusion . . . 7
   Acknowledgements . . . 7
   References . . . 7

Abbreviations: ALA, alpha linolenic acid; ANSES, Agence Nationale pour la Sécurité et la Santé; BDNF, Brain Derived Neurotrophic Factor; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; LA, linoleic acid; MCAO, middle cerebral artery occlusion; PUFA, polyunsaturated fatty acids; SNAP-25, Synaptosomal-Associated Protein 25; VAMP-2, Vesicle-Associated Membrane Protein 2; VGLUT1, Vesicular Glutamate Transporter 1; VGLUT2, Vesicular Glutamate Transporter 2.

* Corresponding author at: Institut de Pharmacologie Moléculaires et Cellulaires, UMR7275, C.N.R.S, 06560 Valbonne, France. Tel.: +33 4 93 95 77 40; fax: +33 4 93 95 77 08.
E-mail address: Blondeau@ipmc.cnrs.fr (N. Blondeau).

2213-4344/$ – see front matter © 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2012.12.002

1. Introduction

Stroke is a worldwide main cause of mortality and morbidity. It causes a significant socioeconomic cost and a marked increase in patient/family burden. More than 1000 molecules have demonstrated brain-protective properties in experimental models. More than 200 clinical trials have examined neuroprotection for ischemic stroke, arguably despite sufficiently persuasive preclinical justification. To date most of the preventive treatments and neuroprotective drugs identified in preclinical studies failed in clinical trials. Therefore testing alternative protective strategies to prevent stroke is of considerable importance. Although there is a consensus that nutrition is important for health, its role is underestimated in stroke prevention. It is recognized that an increase consumption of salt, fatty foods and alcoholic beverages may promote pathologies like hypertension, obesity and alcoholism, all of which are well known risk factors of stroke. In contrast it is more difficult to identify a risk factor arising from a deficiency in an essential nutrient in the diet. Western modern diets are deficient in omega-3 polyunsaturated fatty acids, which are essential for brain health. Such deficiency constitutes by itself a risk factor for cardiovascular and cerebral diseases, including coronary heart disease and stroke. Furthermore, an imbalance in the consumption of omega-6 and omega-3 PUFAs progressively took place in the past 40 years leading to omega-6/omega-3 ratios that are far above the World Health Organization (WHO) healthy recommendations. A consequence of this imbalanced ratio has been the fostering of elevations in and increased prevalence of inflammatory cardiovascular and neuronal diseases and obesity. In this context, nutritional products with health benefits represent a growing interest. Functional foods enriched in omega-3 polyunsaturated acids or omega-3 used as nutraceuticals may reduce the frequency of strokes through preservation of both arterial and neuronal function. This review outlines a promising therapeutic opportunity by integrating a nutritional-based approach focusing on the omega-3 alpha-linolenic acid (ALA) to prevent the devastating damage caused by stroke.

2. Stroke statistics and healthcare

2.1. Stroke statistics

Stroke is the third leading cause of mortality and disability in the world. It has been predicted that stroke will account for 6.2% of the illness total burden in the first nine years in 2000 [1]. The mortality rate at five years is approximately 50% and a stroke strikes every 40 s with one death every 4 min [2,3]. The total number of stroke deaths is estimated at 508,000 per year in European Union; among the elderly population of 15 European countries, surveys showed 2,700,000 prevalent cases, and 536,000 incident cases each year [4]. In the United States, data show a total of 5,800,000 prevalent stroke cases, with 780,000 being first occurrences or recurrent strokes expected each year. Stroke causes many impairments and half of stroke survivors are left to live with physical or cognitive disabilities. This gives rise to real issues with hospital organization, care and public health, invariably exerting a high cost and a burden to society and health systems [5]. Because stroke compromises patients' lives so severely, they will require high levels of assistance and support even for common daily activities, which in turn directly impacts their quality of life – and their supporters. Therefore, those indirect costs contribute to increase the economic burden associate with stroke. The total economic costs (direct and indirect cost) for stroke were estimated at $73.7 billion in 2010 [3]. The only current therapy against stroke is thrombolysis, which is only given to ~5% of patients because of (1) its numerous side effects, the major one being a 6–7% risk of bleeding [6] and; (2) the therapeutic window of 0–4.5 h required to obtain a therapeutic effect of the thrombolytic [7]. Generally, the majority of patients are not treated with rtPA because they arrive after that narrow time window of treatment of opportunity, leaving clinicians without any repertoire of therapeutic opportunities. It is somewhat ironic that clot busters is considered the best 'neuroprotectant', given that it mediates its effect through the vasculature, as opposed to exerting any direct protection in neurons. In a landmark analysis published in 2006, none of the 114 treatments (from more than a thousand treatments demonstrating neuroprotection against acute stroke since the 1960s at the preclinical level) achieved neuroprotection in clinical trials [8]. In addition, these drugs displayed poor adherence to the STAIR criteria (Stroke Therapy Academic Industry Roundtable), designed to increase the rigor by which neuroprotective agents were assessed at the preclinical level, in order to improve the odds of success in clinical trials [9]. This failure in translation from experimental models to clinical trials led to a major exodus of pharmaceutical companies from stroke, and also prompted a major re-evaluation of properties, which would constitute the "best-in class" therapeutics to be used against stroke, integrating several aspect of the pathology of stroke.

2.2. Stroke physiopathology

An ischemic stroke is the result of an occlusion within a blood vessel supplying blood to the brain. This type of stroke accounts for more than ~80% of all stroke cases. The current understanding of its pathophysiology has dramatically evolved over the past two decades mainly due to the animal studies. It is well known that the clot may either be formed locally in a small artery or may arise from the heart or from an injury in the wall of one of the cervical arteries (carotid and vertebral arteries). Occlusion of the middle cerebral artery (MCA) is one of the most widely used experimental models. Interruption of blood flow generated a hypoperfusion in the MCA territory that leads to a rapid decline in oxygen (hypoxia) and nutriments (glucose, ATP, energetic metabolites, etc.). The cut off the supply of oxygen and glucose prevents the brain from generating the ATP needed to support its considerable energy demands. After focal ischemia, this energy deficit is most severe in the core of the ischemic territory that displays the lowest residual flow, wherein cell death occurs rapidly. In the core periphery, termed ischemic penumbra, even if reduced collateral blood flow buffers the full effects of stroke, waves of peri-infarct depolarization lead to neurotransmitter release. In concert with impairment of glial reuptake, extracellular glutamate achieves neurotoxic concentrations. Within the entire ischemic territory, glutamate overload into the extracellular space results in an hyperactivation of its receptors (excitotoxicity) leading to accumulation of intracellular Ca^{2+}, which in turn sets off deleterious events including activation of lytic enzymes, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress [9–11]. Irreversible damages are caused to neuronal membrane and compromise brain tissue survival. Initiation of these pathologic pathways differs in space and time (Fig. 1) and also depends of the cellular subtype (neuronal or vascular, for example) [12].

Historically, stroke research aimed to target one element of the deleterious cascade that takes place during stroke [8]. It failed to identify and validate an effective drug able to protect the neurovascular unit. Although restoration of cerebral blood flow can be successfully applied in a small 5% subset of patients by recombinant tissue plasminogen activator, there is still no therapeutic for stroke, underlining a pressing need to investigate additional strategies. Epidemiologic studies have demonstrated most patients presenting with a stroke possessed at least one risk factor. In addition, the pre-existence of certain risk factors in the

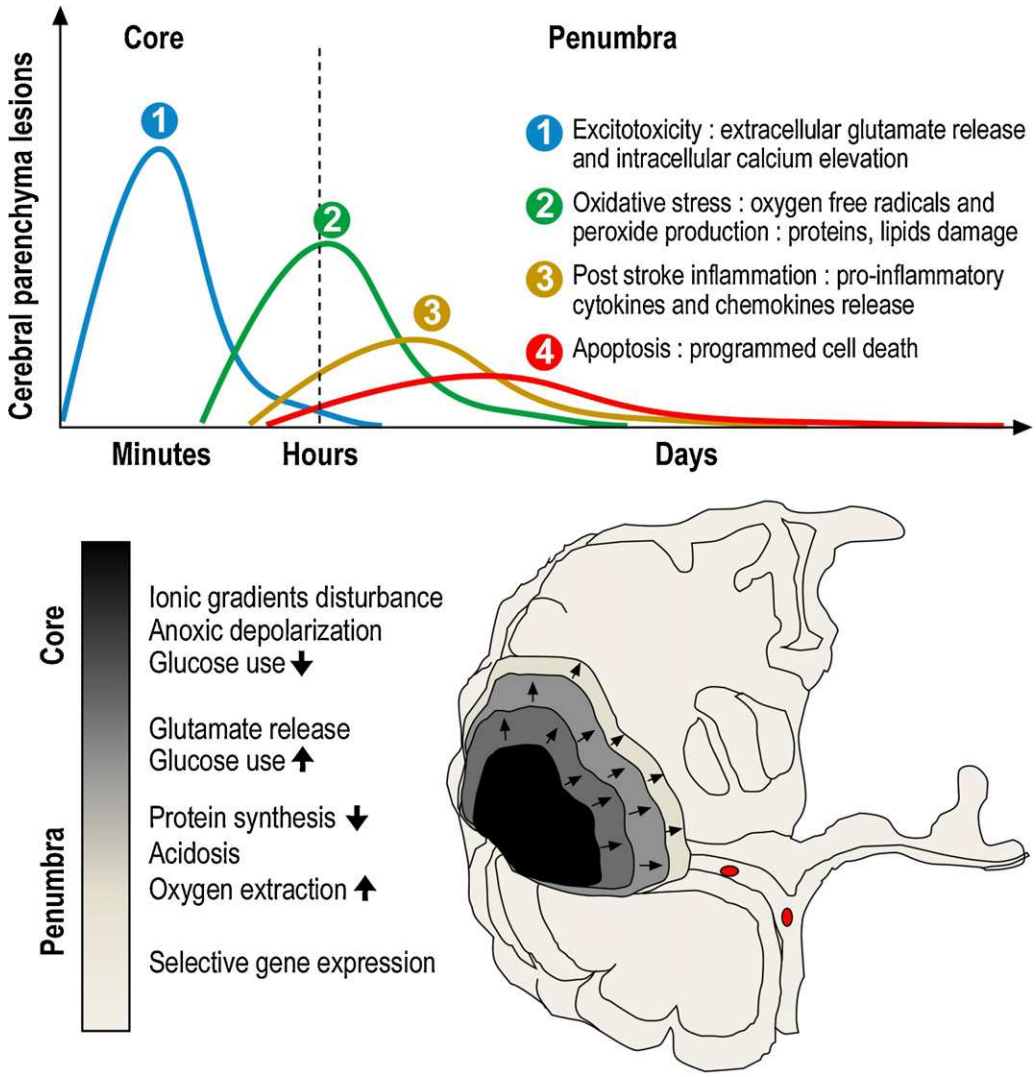


Fig. 1. Initiation of stroke induced – pathologic signaling pathways differs in space and time. The *x*-axis reflects the evolution of the cascade over time, while the *y*-axis illustrates the impact of each event of the cascade on final outcome. Rapidly after the onset of the focal perfusion deficit, excitotoxic mechanisms trigger primarily neuron but also glia necrosis. In addition, excitotoxicity initiates a number of events leading to the demise of the brain tissue. This includes peri-infarct depolarizations and more delayed neurotoxicity mechanisms such as inflammation and programmed cell death. A brain region experiencing low rates of perfusion in which cells have lost their membrane potential terminally (core) is surrounded by an area in which intermediate perfusion prevails (penumbra) and cells depolarize intermittently (peri-infarct depolarization). Note that from the onset of the focal perfusion deficit, the core and penumbra have different neurotoxic mechanistic dynamics in space and timing.
Modified from Dirnagl et al. [12].

patient history may worsen stroke outcome and compromises seriously post-stroke rehabilitation. These risk factors may also compromise also the patient eligibility to thrombolysis therapy [13]. Therefore, prevention of risk factors is one of the emerging axes of stroke care.

2.3. Stroke, risk factors and nutrition

Severable modifiable and non-modifiable risk factors for ischemic stroke have been identified. Non-modifiable and irreversible risk factors include age, gender, ethnicity, and heredity. Among modifiable risk factors are hypertension, hypercholesterolemia, alcohol, smoking, atrial fibrillation, obesity and diabetes, which are in constant progression in all industrialized countries. The coexistence of modifiable risk factors has been estimated at up to 80% of stroke incidence [14]. It is worth noting that modifiable risk factors of stroke often coexist with improper life-style and poor nutrition, causing imbalances in essential vitamins and nutriments, such as polyunsaturated fatty acids (PUFA) from the omega-3 family. Many clinical and epidemiologic studies have shown that insufficient dietary intake of fruits and vegetables causing deficiencies in vitamins, nutrients, and essential omega-3 PUFAs may be risk factor for cardiovascular and cerebral diseases, including stroke [15]. It is now clear that the evolution of human diet and the modernization of food manufacturing processes account for most of the essential nutrient deficiencies in our diet. As an example, the western diets provide an excessive quantity of omega-6 at the expense of omega-3. In the majority of the adult population of developed countries, omega-3 intake is far below the recommended Dietary Reference Intake, while consumption of omega-6 is more than 10 times higher than for omega-3. Consequently, the reported omega-6/omega-3 ratio is often above 10–15, compared to a ratio of approximately 5 recommended by most of the international Health organizations [16]. This elevated ratio represents strong evidence of an imbalance in the intake of these two families of essential fatty acids. Several epidemiologic studies demonstrated beneficial effects of diets enriched in omega-3 on various cerebral diseases, also suggesting that they may reduce the risk of stroke. Meanwhile, the few preclinical studies that addressed their potential protective role against

stroke-induced damage suggest that the nutraceutical potential of omega-3 could be a field of study of potentially major relevance. Altogether it emphasizes the need to focus more closely on the members of the omega-3 family and their nutraceutical potential in stroke.

3. Why the polyunsaturation matter in omega-6 and omega-3

3.1. Omega-6/omega-3 structure

Omega-3 and omega-6 PUFA families are structurally similar, with both containing a carbon long chain linked to hydrogen atoms punctuated by double bonds (unsaturation) and terminated by an acidic group. The conventional nomenclature differentiates the chemical structure of omega-3 and omega-6 by the location of the first double bond that is marked from the methyl-terminal extremity. All fatty acids contain their first double bound between the 6th and 7th carbon atoms in the omega-6 family, and between the 3rd and 4th carbon atom in the omega-3 fatty acids. Mammals cannot synthesize alpha-linolenic (ALA, C18:3ω3) and linoleic (LA, C18:2ω6) acids, which are PUFA omega-3 and omega-6 families precursors, respectively. By analogy with essential amino acids, ALA and LA are essential fatty acids and have to be supplied by the diet [17]. LA metabolism leads to the production of arachidonic acid (AA, C20:4ω-6) and docosapentaenoic acid (C22:6ω-6). ALA is successively transformed to eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5ω-3) which converts to docohexaenoic acid (DHA, C22:6ω-3). In mammals, the same enzymes (desaturases and elongases) participate in the synthesis of omega-3 and omega-6 long chain PUFA (Fig. 2). This results in a competition between both families to access the enzymatic pathway. The bioconversion rate of ALA to EPA and DHA is extremely low, accounting for why the omega-3 long chain are also considered as practically essential since they are almost all supplied by the diet [18]. Moreover, enzymes involved in the metabolism of LA and ALA (elongases and desaturases) have a high preference for LA [19]. Their activity is inhibited by risk factors for stroke such as sugar, alcohol, saturated fat, aging and diabetes that are all well described. Therefore, any change in our diet, especially in the diary intake of LA and ALA impacts the ratio omega-6/omega-3, raising concerns of omega-3 levels being too low to support protection or resistance against disease development. Recommendations made based on epidemiologic studies underline the necessity restoring the balance omega-6/omega-3 to a ratio of 5:1, although this "ratio theory" appears relevant if minimal and/or adequate amounts of omega 3 are ingested. The effects of a decrease or an increase in omega-3 or omega-6 fatty acids content in efforts to optimize the ratio are likely to be very different at the physiological and the pathophysiological level. The absence of a comprehensive knowledge is the risk of distracting attention in the public away from increasing absolute intakes of omega-3 fatty acids, which have been shown to have beneficial effects, especially on cardiovascular health [20]. Thus, it may be too early to definitely conclude on the usefulness of the omega-6/omega-3 ratio concept, as its successful translation to daily life will require a more integrative view of the difference between the omega-3 fatty acids ALA, EPA and DHA or the omega-6 fatty acids LA and AA. In this context, the "Lyon Diet Heart Study" reported the importance of increasing the ALA intake and controlling the LA/ALA ratio on cardiovascular diseases. After a first myocardial infarction, patients fed an ALA-rich diet had a markedly reduced rate of recurrence, other cardiac events and overall mortality, compared to patients fed the usual post-infarct prudent diet, that also contains omega-3 fatty acids [21].

It is therefore acknowledged that omega-6 and omega-3 fatty acids should be consumed in a balanced manner, from a variety of sources (vegetal and animal fats). The large availability and the low

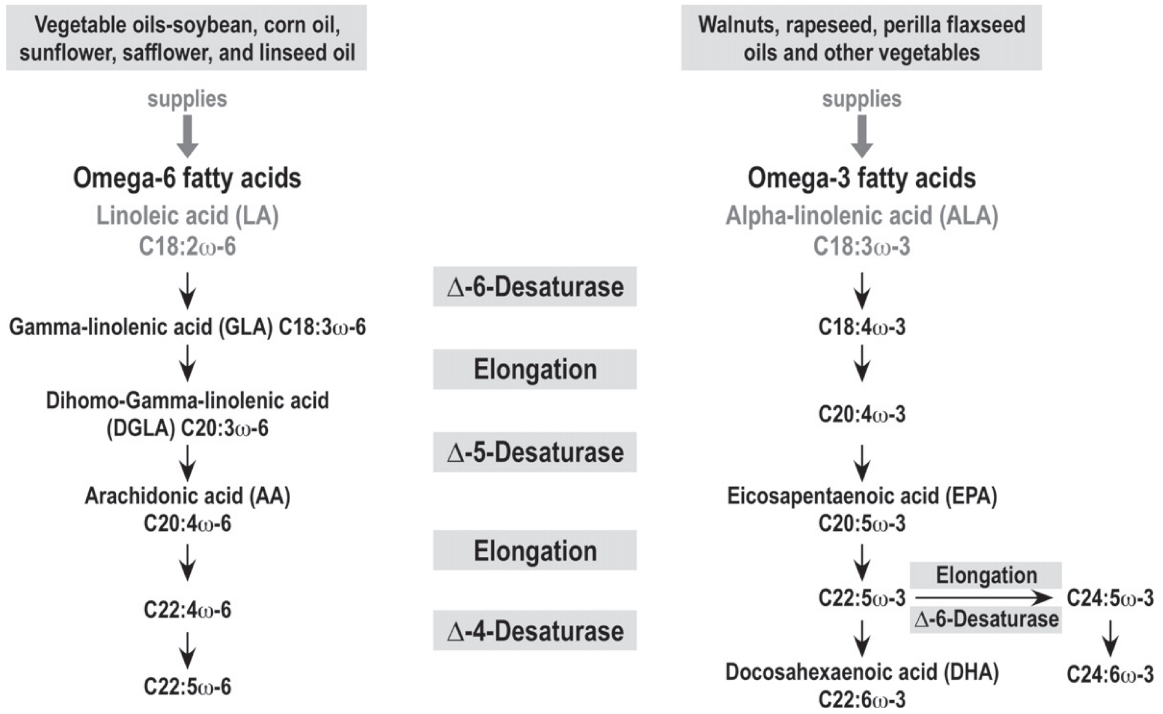


Fig. 2. Biosynthesis of the omega-6 and omega-3 PUFA. The omega-6 and omega-3 families possess structural similarities. In mammals, the synthesis of the long chain derivatives from their distinct precursors LA and ALA involves the same enzymes (desaturases and elongase). This creates a competition between both families to develop the metabolic derivatives. LA is desaturated to form gamma-linolenic acid (GLA, 18:3 omega-6) that in turn is elongated to form DGLA (20:3 omega-6), the precursor of one series of prostaglandins (PGs). GLA is also converted to form AA (arachidonic acid, 20:4 omega-6), the precursor of 2 series of PGs, thromboxanes (TXs) and 4 series leukotrienes (LTs). Similarly, ALA is converted to eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 omega-3), the precursor of 3 series of PGs, TXs, and 5 series LTs. EPA is also converted to form docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 omega-3). Thus, excessive intake of LA can compromise eicosanoid acid (EPA) and docohexaenoic (DHA) production from ALA, the major long chains PUFA.

Table 1
linoleic and alpha-linolenic acids composition of plant oil (g/100 g).

Vegetable oil	Total fat	Total PUFA	LA	ALA	Ratio LA/ALA
Sunflower oil	100.0	59.8	59.4	0.3	205/1
Sesame oil	100.0	41.2	40.7	0.5	85/1
Palm oil	100.0	9.3	9.0	0.2	48/1
Olive oil	100.0	9.5	8.8	0.7	13/1
Soybean oil	100.0	62.3	55.1	7.2	8/1
Canola oil	100.0	28.5	18.4	10.0	1.8/1

Modified from Michaelsen et al. [22].
The type of omega-3 PUFA is a function of their origin (animal *versus* vegetable). Animal sources of omega-3 provide EPA/DHA and display an omega-3/omega-6 ratio in accordance to nutritional recommendations, but are often deprived of ALA. In contrast, vegetable sources of omega-3 are rich in ALA but not EPA/DHA. Only linseed, rapeseed and walnut oils offer an omega-3/omega-6 ratio lower than the recommended limit of 5. LA, linoleic acid; ALA, alpha-linolenic acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid.

cost of food sources containing trans fatty acids that are now recognized as detrimental to health facilitate their consumption in excess. In the same vein, human major food sources of PUFAs are omega-6-rich and omega-3-poor. Moreover, the nature of the omega-3 source shapes the content in omega-3 PUFAs. Animal sources that are rich in omega-3 are mostly fish. They provide EPA and DHA and display an omega-6/omega-3 ratio extremely favorable to omega-3. Although animal sources could be used to counteract an unbalanced diet, they are often deprived of ALA. On the contrary vegetable sources of omega-3 may be rich in ALA but not in EPA and DHA and only linseed, rapeseed and walnut oils furnish an omega-6:omega-3 ratio corresponding to the WHO recommendations (inferior to 5, Table 1). ALA is found in diets enriched in vegetable such as red kidney beans and lima beans. Vegetable oil is one of the most important sources of PUFA (Table 1). However, several of the most commonly used oils have very low levels of PUFA (e.g. palm oil) and often very low levels of ALA (e.g. sunflower oil, sesame oil, and palm oil) [22]. Hence, the need for a diet enriched in the different categories of omega-3 seems necessary to ensure that intake is adequate to allow restoration of an optimal balance of essential fatty acids.

3.2. The omega-3 family: DHA and EPA versus ALA supplementation

Although the term nutraceutical is commonly used in marketing, it has no regulatory definition. According to DeFelice, who first proposed the term coined from "nutrition" and "pharmaceutical", nutraceutical can be defined as a food (or food extract) that provides medical or health benefits, including the prevention and/or treatment of a disease. As compared to functional food or dietary supplements that support the body with the required amount of vitamins, fats, proteins, carbohydrates, etc., needed for its proper functioning, nutraceutical, which may be used in functional food or supplements should also have a proven efficiency preventing and/or treating disease [23]. The current approach to establish the efficacy of nutraceutical or nutritional interventions suffers from several limitations. We believe for clarity sake, that the used of nutraceutical may be restricted to compound isolated or purified from foods, and that could be used in medicinal forms. In this context, the interest for omega-3 as a nutraceutical has been focused mainly on long chain PUFA, EPA and DHA more than their precursor, ALA. Several reasons support this trend. A major reason is that ALA bioconversion to DHA seems very limited, with many studies reporting that conversion efficiency from ALA to its immediate metabolite EPA is 0.4% and the overall efficiency of conversion to DHA is less than 0.1% [24,25]. Diet supplementation with high levels of ALA leads to small increases in EPA (5%) as compared to supplementation with preformed EPA that is approximately 15-fold more efficient [18]. Barcelo-Coblijn and Murphy published a detailed review, which examined publications studying conversion of ALA to EPA and DHA. Their conclusion was that exclusive consumption of ALA could not fulfill DHA requirements [26]. It is also often suggested that EPA and DHA combination may be more efficient in reducing the cardiovascular risk than ALA [27,28]. But, as shown in numerous studies, ALA exerts identical effects as DHA in different physiological processes, although longer periods and higher amounts of consumption of ALA are probably required [26]. Unfortunately, while most of the studies reported biophysical and functional properties of DHA and EPA, intrinsic properties of ALA have not been highlighted and its potential as nutraceutical, a field of study of potential major relevance has been inadequately addressed.

3.3. Beneficial effects of ALA: the origin of the concept

The pioneering studies of Tinoco and colleagues demonstrated important functions of ALA in animals. ALA deficiency in rat alimentation over several generations causes vision and brain function impairments [29]. Since that point, some *in vitro* and *in vivo* studies examining the effect of ALA on neurons directly demonstrated its potential against glutamate-mediated excitotoxicity, a neurodestructive phenomenon shared by many acute and chronic neurodegenerative diseases including epileptic seizures, acute spinal cord injury (SCI) and stroke [15]. In an experimental model of SCI in rats, ALA treatment 30 min before trauma reduced lesion size by 45% and improved neuronal survival and locomotor activity measured one week after injury [30]. The beneficial effects of ALA on function, neuronal/glia survival and biochemical marker in various SCI models were reviewed in animals subjected to SCI [31,32]. In a model of epilepsy induced by kainate administration, a powerful activator of glutamate receptor system, ALA prevented neurotoxicity and seizure-like activity [33,34]. *In vitro*, ALA reduced hippocampal neuronal death induced by excitotoxic concentration of glutamate [35]. Finally, chronic intake of the "SR-3", a fatty acid compound with LA/ALA ratio of 4, promoted neuroprotection against pentylenetetrazol-induced seizures in rat [36].

Despite the fact that a direct link between ALA deficiency and cardiovascular disease has not been clearly demonstrated to date, epidemiological and correlations studies outlined its potential in cardiovascular diseases. Mediterranean and Japanese populations that consume foods rich in ALA are more resistant to cardiovascular disease [37]. Djoussé et al. have investigated whether ALA consumption was associated with a lower risk of carotid atherosclerosis. Dietary ALA was inversely related to the thickness of carotid arteries, whereas fish-EPA and DHA consumption was not, suggesting that ALA could prevent the progression of atherosclerosis [38]. In addition to the protective effect of ALA against atherosclerotic plaque in coronary artery, dietary ALA prevented hypertension [38]. With regard to stroke, ALA plasma level increases seems to be correlated with a 37% decrease of the stroke risk [39]. These results indicate that ALA may play a role in the prevention or therapy of cardiovascular and neurovascular diseases.

4. ALA and stroke

We have stressed the fact that the lack of omega-3 fatty acid could result in serious consequences for heart and brain health. As for cardiovascular diseases, many strokes caused by unhealthy diet and lifestyle could potentially be avoided. In this context, and in view of the recurrent failures in the development of drugs to prevent stroke, nutraceuticals or functional food enriched with omega-3 like ALA may represent a promising opportunity in prevention and perhaps also in treatment of neurovascular insults.

4.1. ALA and the neurovascular unit

Our interest in omega-3 originated from our discovery of their ability to activate the potassium channel TREK-1, regarded as a promising molecular target for new neuroprotective strategies [40]. Electrophysiology experiments revealed that ALA and its long chain derivatives EPA and DHA activate this channel, leading to cell hyperpolarization that may counteract lethal neuronal depolarizations associated with glutamate excitotoxicity, a key mechanism of stroke-induced neurodegeneration [34]. Although the protection may involve calcium, sodium and potassium conductance regulation, TREK-1 activation is compulsory for ALA-induced protection against stroke. In contrast, omega-6 PUFA like LA and AA seem less efficient in activating TREK-1 potassium channels and saturated fatty acids like palmitate, stearate and arachidate have no effects. In animal models reproducing the cerebral consequence of a myocardial arrest and epileptic seizure – a regular consequence in stroke – omega-3 acute injection reduced neuronal loss [33,34]. ALA cerebral protection is probably mediated by a direct effect on neurons, although ALA may exert its beneficial effect acting on the vascular compartment. Stroke injury also affects vascular functions altering the tonus of the injured artery. The loss of vasodilation capacity compromises the perfusion of the cerebral tissue. *In vitro*, ALA application onto basilar artery promotes its vasodilatation. This effect is specific to resistance arteries and does not extend to the carotid artery, explaining the absence of systemic effect on arterial pressure [41,42]. Cerebral blood flow measurement by laser Doppler revealed that injection of neuroprotective dose of ALA increased rates in rodents, as compared to the saturated fatty acids palmitate. ALA is not only beneficial to neurons but is also of great interest also for blood vessels. This implies that ALA could be beneficial for the whole neurovascular compartment, compared to a large number of typical stroke neuroprotective chemical molecules which only target neurons, and have failed in clinical trials. ALA might represent a successful neuroprotectant where many had tried and failed.

4.2. ALA in an experimental model of focal ischemic stroke

In hypertensive rats highly predisposed to stroke, Shimokawa and colleagues highlighted that a diet enriched in perilla oil (60% ALA) increases rat lifetime, compared to a diet enriched in sunflower oil (rich in linoleic acid) [43]. In humans, a clinical study conducted in 192 patients revealed a strong correlation between ALA plasma levels in patients and a reduction in stroke susceptibility [39]. In humans, the occlusion of the sylvian artery represents about 70% of stroke events. In a mouse model of ischemic stroke by the transient occlusion of the middle cerebral artery (MCAo), we investigated whether the intravenous injection of ALA could reduce the infarct volume. Our results show that ALA injection is effective when injected up to 6 h after stroke onset, a time-frame probably compatible with a clinical setting. Those results are similar to those obtained with riluzole, a well described neuroprotectant, delivered in amyotrophic lateral sclerosis, suggesting that a nutraceutical like ALA could perform as a chemical. Interestingly, a single ALA post-treatment did not improve long term survival, but several staggered post-treatment ALA injections improved the survival rates three fold measured one month after stroke onset [44]. This chronic ALA treatment when used as pre-treatment also reduces the post-ischemic infarct 24 h after MCAo [35].

As a bolus injection of ALA also promotes neuroprotection and recovery in different murine models of spinal cord injury [30,45], providing ALA by I.V. route may offer an intriguing prospect as a potentially new therapeutic approach in acute neurodegenerative conditions. Our group, like several others, has also shown the potential for EPA/DHA injection in animal models of neurodegenerative conditions (for review see: [15,31,32,46]), including acute neurological injury like stroke [33,34] and spinal cord injury [47,48]. With regard to the clinical safety of omega-3 fatty acids I.V. perfusion (so-called parenteral supplementation), it has not only been regarded as safe but also improves the clinical diagnosis- and organ failure-related outcome – apart from neurological conditions that were not addressed [49,50]. Thus it is tempting to speculate that administration of omega-3 fatty acids may reduce mortality and length of hospital stay for different diseases. Given the proven clinical safety of omega-3 PUFAs, ours and other experimental data suggest that omega-3 PUFAs injections may display significant therapeutic potential in human ischemic condition.

4.3. ALA supplementation, synaptogenesis and neurogenesis

The crucial evidence that ALA needs to be chronically injected to promote long term benefit suggests that ALA-induced protection against stroke is not exclusively built on its capacity to reduce glutamate-mediated excitotoxicity, a transient phenomenon that takes place during the first few hours post-ischemia. Since we have showed that omega-3 might stimulate endogenous protective pathways [33,35,51], it underlines the necessity to dissect the subchronic ALA effects *per se*. We discovered that ALA treatment promotes neuronal plasticity, which may contribute to brain repair after stroke. Indeed this subchronic ALA treatment *per se* increases neurogenesis in the dentate gyrus. The neurogenesis accompanies an increase in synaptogenesis in the dentate gyrus, but also in the cortex as shown by an increase in the expression of proteins involved in synaptic function. ALA treatment induces VAMP-2 (Vesicle-Associated Membrane Protein 2, also called synaptobrevin) and SNAP-25 (Synaptosomal-Associated Protein 25) expression, which are involved in vesicle budding in the synaptic active area. Synaptophysin-1, a protein of the vesicular membrane participating to presynaptic fusion pore involved in neurotransmitter release, is also upregulated as well as the glutamate transporter expression (VGLUT1 and VGLUT2). These effects are strongly correlated with an increase of BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) observed both in the brain of treated mice *in vivo* and in neural stem cells or in hippocampal cultures *in vitro*. Thus, the ALA protective effects mediated by a direct action on the neurovascular unit may also be supported by the stimulation of endogenous mechanisms involved in regeneration and recovery.

4.4. Dietary ALA against stroke

Since ALA supplementation by I.V. route is not relevant for prevention, we studied the possibility of providing ALA by a nutritional approach, by using an ALA-enriched vegetable oil such as rapeseed oil (9% ALA) to attain cerebral protection similar to that attained by ALA chronic injections. A 6-week diet enriched in ALA by a factor of three compared to regular chows and an omega-6/omega-3 ratio below 5 reduced cerebral infarct volume. It is worth noting that diets enriched in ALA did not contain any long chain fatty acids EPA and DHA, while the regular chow did, in proportions already matching the "murine" recommended intake [52,53]. This reinforces the message that increasing ALA intake decreasing the LA/ALA ratio may exert a protective role in stroke. The rapeseed oil-diet decreased the mortality rate three-fold and increased the spontaneous reperfusion probability measured 24 h post-MCAo [54]. This diet also decreased lipid peroxidation and oxidative stress associated with the brain ischemia. Beneficial effects were similar to those of parenteral supplementation and may be more

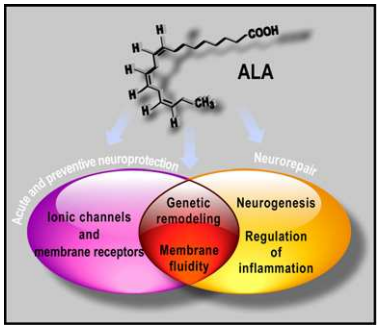


Fig. 3. ALA potential on different level of stroke-induced damages. The schematic summarizes the different properties of ALA that could counteract stroke-induced damage.

efficient than those obtained by a supplementation with fish oil enriched in EPA/DHA, a paradigm still debated [15,44–46]. The rapeseed oil diet does not contain EPA and DHA; as mentioned previously, ALA is not sufficiently converted to DHA, so the ALA-associated protection probably does not involve a bioconversion of ALA in EPA/DHA.

5. Conclusion

Classic neuroprotectors failed in stroke clinical trials. Researchers now focus on molecules acting on the whole neurovascular compartment and are searching for neuroprotectant-promoting protective mechanisms capable of acting at different intervals to counteract the different pathologic pathways. Then, it is tempting to speculate that ALA may adhere to the criteria of being a pleiotropic molecule (Fig. 3), able to block the deleterious neurotoxic signaling cascades in neurons, stimulate vascular function and also to stimulate defense and recovery mechanisms. The nutritional importance of ALA and its pleiotropic benefits should lead the scientific and medical community to focus interest in this particular omega-3 in other neurologic pathologies. Indeed, many recommendations relating to the omega-3 consumption have been issued, including by the WHO [55]. However, a wide range of qualities and quantities were recommended. With regard to the use of omega-3 as therapeutics, it seems that the adverse effects – when used at high doses – may been restricted to symptoms of nausea, as the risk of hemorrhagic events was not clearly established. In the United States, the statute of Generally Recognized As Safe defines a maximal limit of 3 g/day of long chain omega-3 in nutritional complements, which matches the French recommendation not to exceed more than 15 times the Daily Recommended Intake [56]. Thus, the most common recommendations that have been made for ALA (1 g/day), EPA (250 mg/days) and DHA (250 mg/day) in normal condition and of 1 g/day (ALA), 0.750–1 g/day (EPA + DHA) for patients at risk of cardiovascular diseases are largely achievable. Therefore the interest in omega-3 to prevent both the risk of stroke and its associated brain damage seems definitely relevant.

Conflict of interest

None.

Acknowledgements

The GLN, ONIDOL, the Fondation de la Recherche Médicale and the CNRS supported this work. The authors thank Dr Bernadette Delplanque for many helpful discussions and all our past and present team members, especially Julia Magnin and collaborators who have contributed to the data discussed in the review.

References

[1] Menken M, Munsat TL, Toole JF. The global burden of disease study: implications for neurology. Archives of Neurology 2000;57:418–20.
[2] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, De Simone G, et al. Heart disease and stroke statistics – 2010 update: a report from the American heart association. Circulation 2010;121:e46–215.
[3] Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al. Heart disease and stroke statistics – 2008 update: a report from the American heart association statistics committee and stroke statistics subcommittee. Circulation 2008;117:e25–146.
[4] Di Carlo A, Launer LJ, Breteler MM, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, et al. Frequency of stroke in Europe: a collaborative study of population-based cohorts. Ilsa working group and the neurologic diseases in the elderly research group. Italian longitudinal study on aging. Neurology 2000;54:S28–33.
[5] Spieler JF, Lanoe JL, Amarenco P. Costs of stroke care according to handicap levels and stroke subtypes. Cerebrovascular Diseases 2004;17:134–42.
[6] Kaur J, Zhao Z, Klein GM, Lo EH, Buchan AM. The neurotoxicity of tissue plasminogen activator. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 2004;24:945–63.
[7] Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. New England Journal of Medicine 2008;359:1317–29.
[8] O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW. 1026 experimental treatments in acute stroke. Annals of Neurology 2006;59:467–77.
[9] Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. Neuron 2010;67:181–98.
[10] Endres M, Dirnagl U. Ischemia and stroke. Advances in Experimental Medicine and Biology 2002;513:455–73.
[11] Moustafa RR, Baron JC. Pathophysiology of ischaemic stroke: insights from imaging, and implications for therapy and drug discovery. British Journal of Pharmacology 2008;153(Suppl. 1):S44–54.
[12] Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends in Neurosciences 1999;22:391–7.
[13] Naess H, Waje-Andreassen U, Nyland H. Risk factor burden predicts long-term mortality in young patients with arterial cerebral infarction. In: Acta Neurologica Scandinavica. John Wiley & Sons A/S; 2012. http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0404.2012.01681.x.
[14] Allen CL, Bayraktutan U. Risk factors for ischaemic stroke. International Journal of Stroke 2008;3:105–16.
[15] Blondeau N, Tauskela JS. A new future in brain preconditioning based on nutraceuticals: a focus on a-linolenic omega-3 fatty acid for stroke protection. In: Gidday JM, Perez-Pinzon MA, Zhang JH, editors. Innate tolerance in the CNS. New York: Springer; 2013. p. 133–63.
[16] World Health Organization. Who and fao joint consultation: fats and oils in human nutrition. Nutrition Reviews 1995;53:202–5.
[17] Holman RT. Nutritional and metabolic interrelationships between fatty acids. Federation Proceedings 1964;23:1062–7.
[18] Brenna JT, Salem Jr N, Sinclair AJ, Cunnane SC. Alpha-linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2009;80:85–91.
[19] Emken EA, Adlof RO, Gulley RM. Dietary linoleic acid influences desaturation and acylation of deuterium-labeled linoleic and linolenic acids in young adult males. Biochimica et Biophysica Acta 1994;1213:277–88.
[20] Stanley JC, Elsom RL, Calder PC, Griffin BA, Harris WS, Jebb SA, et al. UK food standards agency workshop report: the effects of the dietary n-6:N-3 fatty acid ratio on cardiovascular health. British Journal of Nutrition 2007;98:1305–10.
[21] de Lorgeril M, Salen P. Alpha-linolenic acid and coronary heart disease. Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases 2004;14:162–9.
[22] Michaelsen KF, Dewey KG, Perez-Exposito AB, Nurhasan M, Lauritzen L, Roos N. Food sources and intake of n-6 and n-3 fatty acids in low-income countries with emphasis on infants, young children (6–24 months), and pregnant and lactating women. Maternal & Child Nutrition 2011;7(Suppl. 2):124–40.
[23] Kalra EK. Nutraceutical – definition and introduction. AAPS PharmSci 2003;5:E25.
[24] Hussein N, Ah-Sing E, Wilkinson P, Leach C, Griffin BA, Millward DJ. Long-chain conversion of [13c]linoleic acid and alpha-linolenic acid in response to marked changes in their dietary intake in men. Journal of Lipid Research 2005;46:269–80.
[25] Pawlosky RJ, Hibbeln JR, Novotny JA, Salem Jr N. Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans. Journal of Lipid Research 2001;42:1257–65.
[26] Barcelo-Coblijn G, Murphy EJ. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. Progress in Lipid Research 2009;48:355–74.
[27] Burdge GC, Calder PC. Dietary alpha-linolenic acid and health-related outcomes: a metabolic perspective. Nutrition Research Reviews 2006;19:26–52.
[28] Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B, et al. N-3 fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. American Journal of Clinical Nutrition 2006;84:5–17.
[29] Tinoco J. Dietary requirements and functions of alpha-linolenic acid in animals. Progress in Lipid Research 1982;21:1–45.

[30] King VR, Huang WL, Dyall SC, Curran OE, Priestley JV, Michael-Titus AT. Omega-3 fatty acids improve recovery, whereas omega-6 fatty acids worsen outcome, after spinal cord injury in the adult rat. Journal of Neuroscience 2006;26:4672–80.
[31] Dyall SC, Michael-Titus AT. Neurological benefits of omega-3 fatty acids. Neuromolecular Medicine 2008;10:219–35.
[32] Michael-Titus AT. Omega-3 fatty acids and neurological injury. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2007;77:295–300.
[33] Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. Neuroscience 2002;109:231–41.
[34] Lauritzen I, Blondeau N, Heurteaux C, Widmann C, Romey G, Lazdunski M. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. EMBO Journal 2000;19:1784–93.
[35] Blondeau N, Nguemeni C, Debruyne DN, Piens M, Wu X, Pan H, et al. Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke. Neuropsychopharmacology 2009;34:2548–59.
[36] Rabinovitz S, Mostofsky DI, Yehuda S. Anticonvulsant efficiency, behavioral performance and cortisol levels: a comparison of carbamazepine (cbz) and a fatty acid compound (sr-3). Psychoneuroendocrinology 2004;29:113–24.
[37] Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. Experimental Biology and Medicine (Maywood NJ) 2008;233:674–88.
[38] Djousse L, Hunt SC, Arnett DK, Province MA, Eckfeldt JH, Ellison RC. Dietary linolenic acid is inversely associated with plasma triacylglycerol: the national heart, lung, and blood institute family heart study. American Journal of Clinical Nutrition 2003;78:1098–102.
[39] Simon JA, Fong J, Bernert Jr JT, Browner WS. Serum fatty acids and the risk of stroke. Stroke 1995;26:778–82.
[40] Heurteaux C, Guy N, Laigle C, Blondeau N, Duprat F, Mazzuca M, et al. Trek-1, a k+ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. EMBO Journal 2004;23:2684–95.
[41] Blondeau N, Petrault O, Manta S, Giordanengo V, Gounon P, Bordet R, et al. Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the trek-1 potassium channel. Circulation Research 2007;101:176–84.
[42] Garry A, Fromy B, Blondeau N, Henrion D, Brau F, Gounon P, et al. Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the trek1 potassium channel: the endothelial link. EMBO Reports 2007;8:354–9.
[43] Shimokawa T, Moriuchi A, Hori T, Saito M, Naito Y, Kabasawa H, et al. Effect of dietary alpha-linolenate/linoleate balance on mean survival time, incidence of stroke and blood pressure of spontaneously hypertensive rats. Life Sciences 1988;43:2067–75.
[44] Heurteaux C, Laigle C, Blondeau N, Jarretou G, Lazdunski M. Alpha-linolenic acid and riluzole treatment confer cerebral protection and improve survival after focal brain ischemia. Neuroscience 2006;137:241–51.
[45] Lang-Lazdunski L, Blondeau N, Jarretou G, Lazdunski M, Heurteaux C. Linolenic acid prevents neuronal cell death and paraplegia after transient spinal cord ischemia in rats. Journal of Vascular Surgery 2003;38:564–75.
[46] Blondeau N. Alpha-linolenic omega-3 fatty acid for stroke protection: from brain preconditioning paradigm to nutrition. OCL Oléagineux Corps Gras Lipides 2011;18:271–8.
[47] Lim SN, Huang W, Hall JC, Michael-Titus AT, Priestley JV. Improved outcome after spinal cord compression injury in mice treated with docosahexaenoic acid. Experimental Neurology 2012;239C:13–27.
[48] Lim SN, Huang W, Hall JC, Ward RE, Priestley JV, Michael-Titus AT. The acute administration of eicosapentaenoic acid is neuroprotective after spinal cord compression injury in rats. Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2010;83:193–201.
[49] Heller AR, Fischer S, Rossel T, Geiger S, Siegert G, Ragaller M, et al. Impact of n-3 fatty acid supplemented parenteral nutrition on haemostasis patterns after major abdominal surgery. British Journal of Nutrition 2002;87(Suppl. 1): S95–101.
[50] Heller AR, Rossler S, Litz RJ, Stehr SN, Heller SC, Koch R, et al. Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome. Critical Care Medicine 2006;34:972–9.
[51] Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. Activation of the nuclear factor-kappab is a key event in brain tolerance. Journal of Neuroscience 2001;21:4668–77.
[52] Bourre JM, Dumont O, Pascal G, Durand G. Dietary alpha-linolenic acid at 1.3 g/kg maintains maximal docosahexaenoic acid concentration in brain, heart and liver of adult rats. Journal of Nutrition 1993;123:1313–9.
[53] Pudelkewicz C, Seufert J, Holman RT. Requirements of the female rat for linoleic and linolenic acids. Journal of Nutrition 1968;94:138–46.
[54] Nguemeni C, Delplanque B, Rovere C, Simon-Rousseau N, Gandin C, Agnani G, et al. Dietary supplementation of alpha-linolenic acid in an enriched rapeseed oil diet protects from stroke. Pharmacological Research 2010;61:226–33.
[55] Gebauer SK, Psota TL, Harris WS, Kris-Etherton PM. N-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. American Journal of Clinical Nutrition 2006;83:1526S–35S.
[56] Martin A. The "Apports nutritionnels conseilles (anc)" for the French population. Reproduction Nutrition Development 2001;41:119–28.

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2015, Article ID 519830, 8 pages
http://dx.doi.org/10.1155/2015/519830

Review Article

Alpha-Linolenic Acid: An Omega-3 Fatty Acid with Neuroprotective Properties—Ready for Use in the Stroke Clinic?

Nicolas Blondeau,[1,2] Robert H. Lipsky,[3] Miled Bourourou,[1,2] Mark W. Duncan,[4,5] Philip B. Gorelick,[6] and Ann M. Marini[7]

[1] *Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Université de Nice Sophia Antipolis, 660 route des Lucioles, Valbonne, 06560 Sophia Antipolis, France*
[2] *CNRS, IPMC, 06560 Sophia Antipolis, France*
[3] *Inova Neuroscience Institute, Inova Health System, Falls Church, VA 22042, USA*
[4] *Division of Endocrinology, Diabetes & Metabolism, Department of Medicine, School of Medicine, University of Colorado Denver, Anschutz Medical Campus, Aurora, CO 80045, USA*
[5] *Obesity Research Center, College of Medicine, King Saud University, Riyadh 11461, Saudi Arabia*
[6] *Mercy Health Hauenstein Neurosciences & Department of Translational Science and Molecular Medicine, Michigan State University College of Human Medicine, Grand Rapids, MI, USA*
[7] *Department of Neurology and Program in Neuroscience, Uniformed Services University of the Health Sciences, 4301 Jones Bridge Road, Bethesda, MD 20814, USA*

Correspondence should be addressed to Nicolas Blondeau; blondeau@ipmc.cnrs.fr

Received 16 April 2014; Accepted 8 September 2014

Academic Editor: Juliana Maria Leite Nobrega de Moura Bell

Copyright © 2015 Nicolas Blondeau et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Alpha-linolenic acid (ALA) is plant-based essential omega-3 polyunsaturated fatty acids that must be obtained through the diet. This could explain in part why the severe deficiency in omega-3 intake pointed by numerous epidemiologic studies may increase the brain's vulnerability representing an important risk factor in the development and/or deterioration of certain cardio- and neuropathologies. The roles of ALA in neurological disorders remain unclear, especially in stroke that is a leading cause of death. We and others have identified ALA as a potential nutraceutical to protect the brain from stroke, characterized by its pleiotropic effects in neuroprotection, vasodilation of brain arteries, and neuroplasticity. This review highlights how chronic administration of ALA protects against rodent models of hypoxic-ischemic injury and exerts an anti-depressant-like activity, effects that likely involve multiple mechanisms in brain, and may be applied in stroke prevention. One major effect may be through an increase in mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a widely expressed protein in brain that plays critical roles in neuronal maintenance, and learning and memory. Understanding the precise roles of ALA in neurological disorders will provide the underpinnings for the development of new therapies for patients and families who could be devastated by these disorders.

1. Introduction

Dietary approaches for stroke prevention and rehabilitation hold promise to improve outcomes in individuals at risk of stroke and those who have had a stroke [1–4]. Although there is abundant literature that connects reduction in stroke risk to certain dietary elements and increase in stroke risk to other certain dietary components, there is a paucity of clinical trial data to direct the public and clinicians in this important area of clinical need. Compounds with pleiotropic effects aimed at reducing infarct size by one or more mechanisms and improving outcome would be advantageous in reducing the devastating effects of stroke on patients and their families [1–3]. One compound that has been demonstrated to exert neuroprotective, anti-inflammatory, and antidepressant properties is α-linolenic acid (ALA), an 18-carbon, essential omega-3 polyunsaturated fatty acid (PUFA) (Figure 1). In this review we discuss beneficial effects of α-linolenic acid and

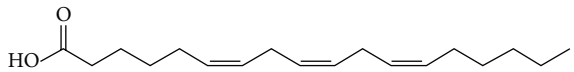


Figure 1: Structure of α-linolenic acid. α-Linolenic acid is an 18-carbon, polyunsaturated fatty acid that is essential for normal health. Because humans do not possess the enzymes to synthesize the compound, it must be obtained from dietary sources.

clinically relevant data to suggest that further exploration of this dietary component might be useful in stroke prevention and recovery.

Omega-3 fatty acids are required for normal health, especially for the brain development and function [16]. Prior work has shown that a seafood-rich diet was associated with low rates of coronary heart disease and autoimmune disorders in Greenland Eskimos which has been generally ascribed to the intake of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid [DHA] [4]. A change in diet over the last century toward a higher total fat and saturated fat content and a sedentary lifestyle has been associated with an increase in the incidence of chronic disorders such as hypertension, diabetes, and atherosclerosis [17–20], all of which are stroke risk factors or risk markers. In addition, omega-6 fatty acids are consumed at a higher level compared with omega-3 fatty acids in a standard western diet and they have been implicated in coronary atherogenesis [21]. The distinction between the two types of PUFAs is underscored by the fact that a higher ratio of omega-6 fatty acids (linoleic acid) to omega-3 fatty acids (alpha-linolenic acid) increases platelet aggregation [22], is prothrombotic, and increases vasoconstriction [1–4, 20, 23]. These effects are presumably due, at least in part, to being integral components of the cell membrane [1, 24]. A large body of evidence from experimental, clinical, and epidemiologic research reports a cardioprotective role of long-chain omega-3 fatty acids EPA and DHA derived primarily from fatty fish. While prospective observational cohort investigations indicated that consumption of fatty fish twice or more a week significantly lowers risk of cardiovascular death [25], the findings from randomized clinical trials examining the effects of fish oil supplementation on cardiovascular disease morbidity and mortality in secondary prevention settings were inconsistent. Fourteen randomized clinical trials were evaluated by both Messori et al. [26] and Kwak et al. [27]. These two groups adopted different statistical methods, but neither found a benefit associated with omega-3 fatty acid supplements versus placebo [26, 27]. Importantly, however, the 14 randomized clinical trials so far reported have been small and short-term studies that were not specifically designed to evaluate CVD end points and, of note, the 2 large open-label trials that report a benefit with omega-3 supplementation [28, 29] were excluded from their analysis. While awaiting more definitive results that include a standardized dose and a formulation maximizing bioavailability, the American Heart Association has released dietary guidelines that recommend intake of fatty fish twice a week, underscoring the view that a cardioprotective diet needs to be rich in omega-3 fatty acids [30–32]. There is extensive literature on the effects of EPA and DHA in cardiovascular disease compared to α-linolenic acid, the precursor of EPA and DHA (see [1, 24] and the references therein).

2. Cardiovascular Disease (CVD) and α-Linolenic Acid

In the absence of definitive evidence, several sources imply, rather than directly state, that the high ratio of omega-6/omega-3 that constitutes the typical western diet may promote the pathogenesis of many diseases, including cardiovascular disease, cancer, inflammatory and autoimmune diseases. It is therefore a widely held belief that restoring the balance omega-6/omega-3 to a ratio of 5 : 1 is important, but this "ratio theory" remains controversial. Indeed, a high omega-6 intake may not be characteristic of many western countries and a focus on the omega-6/omega-3 ratio risk diverts attention away from simply increasing the absolute intake of omega-3 fatty acids, which alone has been shown to have beneficial effects, especially on cardiovascular health [33]. Interestingly, only the daily intake of EPA and DHA was promoted while the absolute and relative change of omega-6/omega-3 in the food between the late paleolithic period and the current US western diet seems mainly mediated by the pronounced change in the linolenic acid (LA): α-linolenic acid (ALA) ratio of the diet [34]. This points out that the importance of ALA as a particularly bioactive component from vegetables food source has been underestimated, especially because humans, like all mammals, cannot synthesize α-linolenic acid (e.g., we do not possess the enzymes for *de novo* synthesis. ALA must therefore be obtained from the diet and excellent sources of ALA include rapeseed and walnuts [35, 36]. In fact, interest in omega-3 in CVD has mainly focused on EPA and DHA rather than ALA because ALA bioconversion to EPA and DHA is minimal and therefore a diet rich in ALA might not fulfill DHA requirements (for review, [37, 38]). Since a wide variety of protective mechanisms were ascribed directly to DHA (for review, [39, 40]), diet supplementation with high levels of ALA has been seen of little interest as compared to supplementation with preformed EPA or DHA. This might have been an unfortunate outcome in view of the growing evidence that dietary ALA may also protect against CVD.

First, ALA-enriched diets have been shown in some animal studies to influence the concentration of lipoprotein in plasma. This ability to decrease low density lipoprotein (LDL) may be of importance as increased levels of LDL in plasma are strikingly correlated with the risk of developing atherosclerosis and CHD. Unfortunately, this plasmatic LDL reduction has not been found in studies in humans, although consumption of ALA-enriched sources affected LDL content in ALA, EPA, and DHA that were increased [41–43]. Second, consumption of ALA-enriched sources and of fish oils rich in EPA/DHA has similar antiarrhythmic properties [44, 45], which are known to reduce the human risk of myocardial infarction and fatal ischemic heart disease. Nevertheless, the conclusion of prospective cohort studies that dietary ALA is beneficial against CVD [46–48] has been recently challenged by a meta-analysis concluding that increasing ALA intake

may only produce modest cardioprotection [49]. In addition to the modification of ionic channels currents induced by the incorporation of these polyunsaturated fatty acids into the cardiomyocytes membrane phospholipid bilayer, which could account for the antiarrhythmic effects, omega-3 PUFAs are paradoxical antioxidant and anti-inflammatory compounds and therefore could indirectly decrease oxidation and inflammation associated with CVD [50–52]. A diet rich in ALA reduces proinflammatory cytokines which in turn is related to the omega-6/omega-3 ratio (i.e., a lower ratio reduces the proinflammatory mediators [7]; inflammation is considered to play an important role in atherosclerosis, a major risk factor for cardiovascular disease and stroke [53]). In a recent study, de Goede and colleagues [54] have examined the 10-year incidence of CHD and stroke in relation to ALA intake in a Dutch population-based cohort of over 20,000 adults. While no association between ALA intake and incident coronary heart disease was observed, their study revealed that ALA intake lowered the risk of stroke. Compared to an Eskimo population where the omega-6/omega-3 ratio is 1, the ratio of a typical western diet is 10/1–25/1 [34]. Thus, increasing the intake of ALA may be beneficial in reducing stroke risk.

3. Stroke and α-Linolenic Acid

A typical western diet is severely deficient in omega-3 fatty acids and this may elevate the risk for stroke [1, 3, 24, 54]. During an ischemic stroke, glutamate excitotoxicity through overactivation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors is the major mechanism of neuronal cell death within the core and surrounding ischemic area called the penumbra. Neuronal necrosis driven by glutamate excitotoxicity occurs within minutes to hours following cerebral ischemia. This creates an extremely reduced time window of intervention for administration of therapeutics aimed at inhibiting glutamate-mediated cell death pathways [55]. This time constraint of acute neuroprotection will probably be difficult to achieve in clinical practice drawing attention to the importance of prevention. The common view of prevention of the risk factors is to reduce the occurrence of stroke. Nevertheless an emerging concept in the field is that nutritional factors may exert a protective role against stroke-induced damage, a field of study of potentially major relevance but still poorly addressed (see [1, 3]).

There is a great deal of evidence that ALA is a potent neuroprotective agent against focal and global ischemia in animal models [11, 56–62]. This same mechanism appears to underlie clinical findings, where, in adult men, serum levels of ALA were independently associated with a 37% reduction in stroke risk [63]. Also, the higher the intake of α-linolenic acid, the lower the prevalence of a carotid plaque [64], and similar results were reported in mice [35]. ALA activates a neuronal background rectifying potassium channel [65] leading to membrane hyperpolarization which in turn increases the magnesium block of the calcium channel associated with NMDA receptors which play a predominant role in mediating glutamate-mediated excitotoxic neuronal cell death [58, 61]. In this rodent model of global ischemia where hippocampal pyramidal neuronal death is mainly driven by glutamate excitotoxicity, we found that ALA exerted a profound protective effect that was more pronounced and reproducible than with EPA and DHA [61]. Additional studies in rodents revealed an essential role for the transcription factor, nuclear factor kappaB, in the ability of ALA to protect neurons against ischemia [11] and to induce tolerance [57], a phenomenon where neurons become resistant to a stressful environment such as ischemia [66]. ALA was shown to increase levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a widely distributed protein that [59] in the brain carries out diverse functions, including neuronal maintenance, learning and memory, neuronal survival, and neurogenesis [67–72]. Other proteins, such as HSP70, a heat shock protein [57, 60], which acts as a protein chaperone, also have roles in regulating programmed cell death (i.e., apoptosis) [73]. While some features are known, the precise mechanisms by which α-linolenic acid exerts its pleiotropic properties in brain are still not clear. Omega-3 fatty acids act via multiple mechanisms such as through the alteration of plasma membrane fluidity, lipid rafts, and signal transduction mechanisms in addition to effects on gene expression [74]. Delineating ALA-mediated mechanisms may increase the number of cellular and molecular targets that lead to enhanced therapeutic efficacy.

4. Stroke and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

Of the known gene targets of ALA, BDNF shows promise as a therapy for stroke. In many studies, BDNF has been shown to reduce infarct size and improve outcome (see [75–77] and the references therein) whereas blocking endogenous BDNF worsens ischemia [78]. Administration of BDNF via the intravenous route as well as the intracerebroventricular route reduced infarct size and improved outcome in the transient middle cerebral artery occlusion model of stroke [79, 80]. However, in humans, anticipated pharmacokinetic challenges make it difficult to develop BDNF itself as a therapy to the clinic [81]. This problem, however, creates opportunities to discover compounds that increase endogenous expression of BDNF in brain. To this end, chronic ALA treatment increases BDNF mRNA and protein levels in the cortex and hippocampus (Figure 2), two brain regions that are susceptible to ischemia but are also involved in plasticity responses. ALA increases neurogenesis, synaptogenesis, and synaptic function in the rodent brain [82]. The ability to increase neurogenesis in the brain is critical because it has been shown that neural stem cells improve neurological function in stroke [83–87]. Neural stem cells can modulate the ischemic environment via the upregulation of survival-promoting/neurotrophic factors such as BDNF and/or by restoring neurotransmitter function by integrating in existing networks and improving network circuitry. Taken together, these findings indicate that ALA induces tolerance and reduces infarct size in animal models of stroke. ALA was also demonstrated to exert antidepressant activity and increase BDNF mRNA and protein levels in the brain which in turn likely stimulates neurogenesis, synaptogenesis, and synaptic function. The benefit between the intake of ALA and the

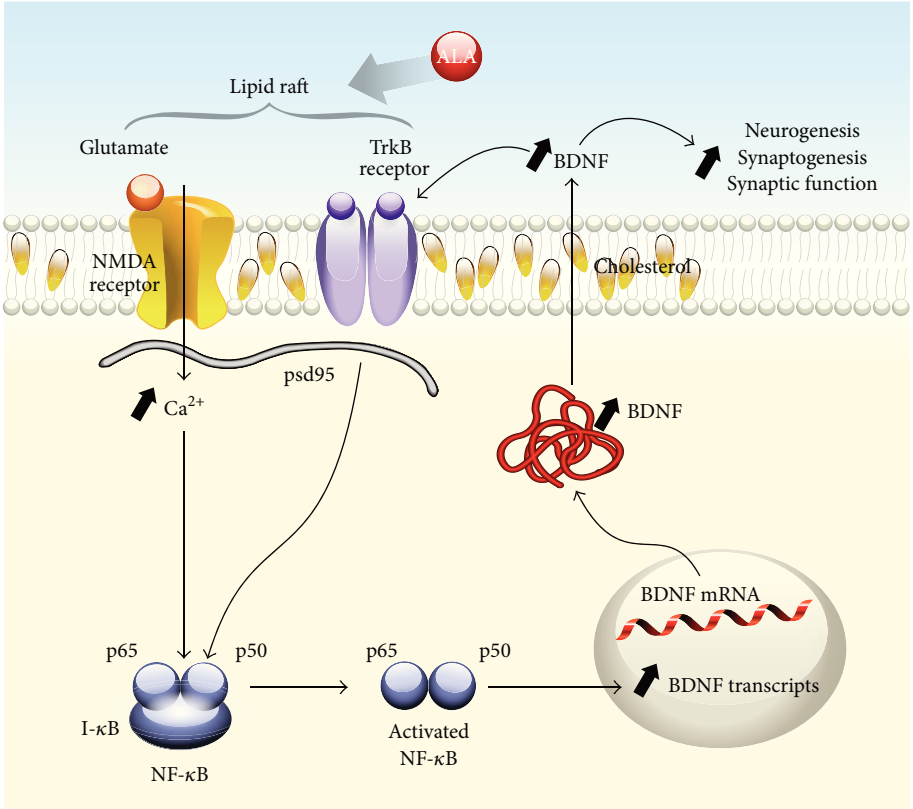


Figure 2: Interplay between NMDA and TrkB receptors mediated by ALA-induced lipid rafts in neuronal plasma membranes. An increase in the nutraceutical ALA is hypothesized to markedly increase membrane fluidity leading to the efficient formation of lipid rafts [5] in neuronal plasma membranes. Lipid rafts are the functional domains of the plasma membrane and play a crucial role in the regulation of transmembrane signaling [6]. TrkB receptors and some NMDA receptors are constituents of lipid rafts [7–10] and one of the major nonprotein components of lipid rafts is cholesterol [6]. The enhanced formation and/or efficiency of transmembrane signaling is hypothesized to result in enhanced activation (phosphorylation) of NMDA and TrkB receptors via the binding of BDNF to its cognate receptor, TrkB. Activation of NMDA receptors results in enhanced calcium influx and activation of signal transduction pathways leading to activation of nuclear factor kappa B (NF-κB) via the canonical pathway (phosphorylation of I-κB leads to its dissociation from the dimer (p65/p50) which then translocates to the nucleus where it binds to κB sites to regulate gene expression) which in turn increases BDNF mRNA and protein levels [11–14]. Enhanced intracellular BDNF protein expression would lead to an increase in secretion, thereby maintaining its availability to bind to TrkB in an autocrine fashion [14, 15] as well as to stimulate neurogenesis, synaptogenesis, and synaptic function at distant sites (paracrine function).

reduction in stroke risk in humans, the substantial evidence that ALA reduces infarct size, improves outcome and survival in animal models and the fact that ALA exhibits a wide safety margin provides a strong rationale for the systematic study of ALA administration in stroke.

5. Stroke, Depression, ALA, and BDNF

Poststroke depression is a common occurrence and can adversely affect outcome after stroke [88]. Stroke and depression are complex and multifaceted diseases but both disorders have common pathological substrates that could be targeted by therapeutic intervention. For example, there is growing evidence that neuroplasticity plays a crucial role in both pathologies. Consequently, compounds that increase neuroplasticity in the brain could ameliorate or prevent an infarct and reduce downstream consequences such as poststroke depression.

A longitudinal study of 50,000 women found that increased intake of ALA reduced depressive symptom [89]. Earlier studies showed similar results [90–92]. In normal mice, ALA treatment (given intravenously or in the diet) exerted an antidepressant effect. This effect was associated with increased synaptogenesis and an increase in BDNF mRNA levels in brain (Figure 3; [82, 93]). Evidence has shown that antidepressant drugs enhance the activation of TrkB receptors, the high affinity receptor that binds BDNF [94] and is a key event in exerting antidepressant properties [82, 94, 95]; BDNF has been implicated in mediating the antidepressant effects in brain [96].

6. Conclusion

In common with several others groups, we have demonstrated the broad neuroprotective and neuroplastic potential of omega-3 injection in animal models of neurodegenerative

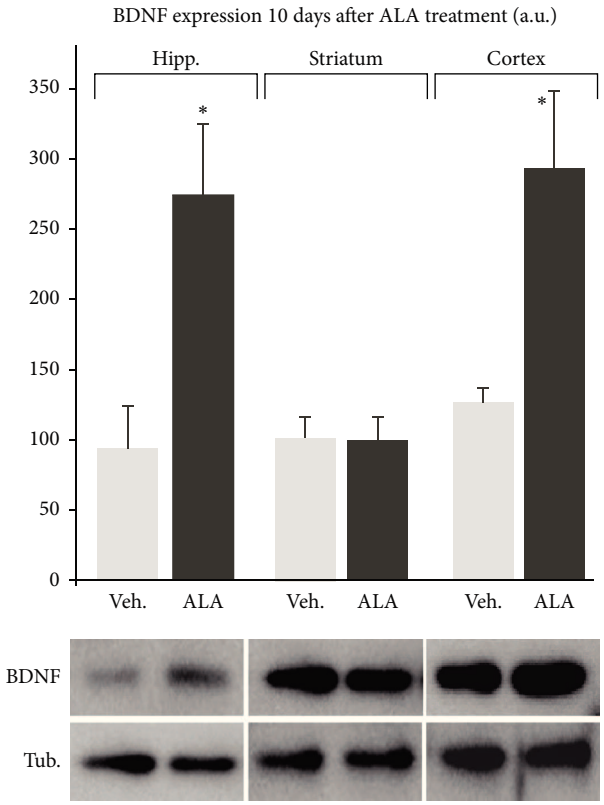


Figure 3: *In vivo* subchronic ALA treatment increases mature BDNF levels in neurons of the cortex and hippocampus, but not in striatum. BDNF increase in these specific brain regions is consistent with well-known properties for the efficiency of antidepressant drugs and with the level of brain protection offered by the subchronic ALA treatment. Mature BDNF expression was measured 10 days after the subchronic treatment by Western blots in cortex, hippocampus ($^{*}P > 0.05$), and striatum ($P < 0.05$) of mice injected with ALA or vehicle. Subchronic treatment consisted of three i.v. injections of 500 nmol/kg of α-linolenic acid on days 1, 3, and 7.

conditions, including acute neurological injuries such as stroke and spinal cord injury (for review, see [1, 3, 97]. In addition, intravenous perfusion of omega-3 fatty acid—in the form of 10% fish oil emulsion supplementing parenteral nutrition—has been shown to improve organ failure-related outcomes [98]. Although the impact of omega-3 fatty acid intravenous supplementation in human neurological conditions has not been addressed, it is tempting to speculate that this approach may offer significant benefit in human ischemic conditions. With regard to omega-3 consumption, a maximum dose of 3 g/day of long chain omega-3 fulfills the Generally Recognized as Safe status in the United States and the French recommendation not to exceed more than 15 times the Daily Recommended Intake [99]. Therefore, we believe that, in light of the currently available data, the conventional recommendations of omega-3 at a dose of 1 g/day of ALA, or 0.750–1 g/day of EPA + DHA, may offer therapeutic benefit in patients at risk of cardiovascular diseases. It is also noteworthy that these doses are without adverse effects. General consensus on the importance of eating for health may turn as a particular commitment for prevention, recovery, and rehabilitation from stroke. Healthy eating after stroke may be important for recovery though additional formal testing is needed, as it could be to improve outcome and reduce reoccurrence. Choosing healthy foods may be a challenge, underlying the importance of identifying natural products with health benefit, like ALA that is a non-proprietary, naturally occurring omega-3 fatty acid contained in foodstuffs. ALA has anti-inflammatory and other potential beneficial properties and, based on the weight of available data, may reduce stroke risk, size, and/or consequences. Sources of α-linolenic acid include but are not limited to flaxseed, rapeseed, and walnuts. ALA is well tolerated and can be supplemented into the diet in a variety of food sources including muffins. The potential benefits of ALA are supported by both animal studies and human observational epidemiologic studies. Early phase clinical trials evaluating α-linolenic acid are justified, and if these indicate benefit, larger scale studies of this agent in stroke prevention should follow.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This work was supported by the Defense Threat Reduction Agency Grant nos. CBM.NEURO.01.10.US.012 and CBM.NEURO.01.10.US.019 and by CNRS and St Hubert and the Fondation pour la Recherche Médicale Grant no. DRM20101220421 to Nicolas Blondeau. The authors thank Dr. Catherine Heurteaux for many helpful discussions and all their past and present team members and collaborators who have contributed to the data and discussion in the review.

References

[1] N. Blondeau and J. S. Tauskela, "A new future in brain preconditioning based on nutraceuticals: a focus on a-linolenic omega-3 fatty acid for stroke protection," in *Innate Tolerance in the CNS*, J. M. Gidday, M. A. Perez-Pinzon, and J. H. Zhang, Eds., Springer Series in Translational Stroke Research, pp. 133–163, Springer, New York, NY, USA, 2013.

[2] C. Nguemeni, B. Delplanque, C. Rovère et al., "Dietary supplementation of alpha-linolenic acid in an enriched rapeseed oil diet protects from stroke," *Pharmacological Research*, vol. 61, no. 3, pp. 226–233, 2010.

[3] C. Nguemeni, E. Gouix, M. Bourourou, C. Heurteaux, and N. Blondeau, "Alpha-linolenic acid: a promising nutraceutical for the prevention of stroke," *PharmaNutrition*, vol. 1, no. 1, pp. 1–8, 2013.

[4] A. P. Simopoulos, "The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases," *Experimental Biology and Medicine*, vol. 233, no. 6, pp. 674–688, 2008.

[5] S. Basiouni, K. Stöckel, H. Fuhrmann, and J. Schumann, "Polyunsaturated fatty acid supplements modulate mast cell membrane microdomain composition," *Cellular Immunology*, vol. 275, no. 1-2, pp. 42–46, 2012.

[6] K. Simons and D. Toomre, "Lipid rafts and signal transduction," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 1, no. 1, pp. 31–39, 2000.

[7] G. Zhao, T. D. Etherton, K. R. Martin, P. J. Gillies, S. G. West, and P. M. Kris-Etherton, "Dietary α-linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 85, no. 2, pp. 385–391, 2007.

[8] T. Mutoh, T. Hamano, A. Tokuda, and M. Kuriyama, "Unglycosylated Trk protein does not co-localize nor associate with ganglioside GM1 in stable clone of PC12 cells overexpressing Trk (PCtrk cells)," *Glycoconjugate Journal*, vol. 17, no. 3-4, pp. 233–237, 2000.

[9] T. Golub, S. Wacha, and P. Caroni, "Spatial and temporal control of signaling through lipid rafts," *Current Opinion in Neurobiology*, vol. 14, no. 5, pp. 542–550, 2004.

[10] S. Besshoh, S. Chen, I. R. Brown, and J. W. Gurd, "Developmental changes in the association of NMDA receptors with lipid rafts," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 85, no. 9, pp. 1876–1883, 2007.

[11] N. Blondeau, C. Widmann, M. Lazdunski, and C. Heurteaux, "Activation of the nuclear factor-κB is a key event in brain tolerance," *Journal of Neuroscience*, vol. 21, no. 13, pp. 4668–4677, 2001.

[12] X. Jiang, F. Tian, Y. Du et al., "BHLHB2 controls Bdnf promoter 4 activity and neuronal excitability," *Journal of Neuroscience*, vol. 28, no. 5, pp. 1118–1130, 2008.

[13] R. H. Lipsky, K. Xu, D. Zhu et al., "Nuclear factor κB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection," *Journal of Neurochemistry*, vol. 78, no. 2, pp. 254–264, 2001.

[14] A. M. Marini, S. J. Rabin, R. H. Lipsky, and I. Mocchetti, "Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 45, pp. 29394–29399, 1998.

[15] X. Jiang, F. Tian, K. Mearow, P. Okagaki, R. H. Lipsky, and A. M. Marini, "The excitoprotective effect of N-methyl-D-aspartate receptors is mediated by a brain-derived neurotrophic factor autocrine loop in cultured hippocampal neurons," *Journal of Neurochemistry*, vol. 94, no. 3, pp. 713–722, 2005.

[16] J. M. Bourre, O. Dumont, M. Piciotti et al., "Essentiality of omega 3 fatty acids for brain structure and function," *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 66, pp. 103–117, 1991.

[17] M. Hedelin, E. T. Chang, F. Wiklund et al., "Association of frequent consumption of fatty fish with prostate cancer risk is modified by COX-2 polymorphism," *International Journal of Cancer*, vol. 120, no. 2, pp. 398–405, 2007.

[18] M. Hughes-Fulford, R. R. Tjandrawinata, C.-F. Li, and S. Sayyah, "Arachidonic acid, an omega-6 fatty acid, induces cytoplasmic phospholipase A_2 in prostate carcinoma cells," *Carcinogenesis*, vol. 26, no. 9, pp. 1520–1526, 2005.

[19] J. Shannon, I. B. King, R. Moshofsky et al., "Erythrocyte fatty acids and breast cancer risk: a case-control study in Shanghai, China," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 85, no. 4, pp. 1090–1097, 2007.

[20] A. P. Simopoulos, "Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 54, no. 3, pp. 438–463, 1991.

[21] J. Regnstrom, J. Nilsson, P. Tornvall, C. Landou, and A. Hamsten, "Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man," *The Lancet*, vol. 339, no. 8803, pp. 1183–1186, 1992.

[22] R. Freese, M. Mutanen, L. M. Valsta, and I. Salminen, "Comparison of the effects of two diets rich in monounsaturated fatty acids differing in their linoleic/α-linolenic acid ratio on platelet aggregation," *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 71, no. 1, pp. 73–77, 1994.

[23] N. G. Bazan, "Omega-3 fatty acids, pro-inflammatory signaling and neuroprotection," *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, vol. 10, no. 2, pp. 136–141, 2007.

[24] N. D. Riediger, R. A. Othman, M. Suh, and M. H. Moghadasian, "A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease," *Journal of the American Dietetic Association*, vol. 109, no. 4, pp. 668–679, 2009.

[25] K. He, Y. Song, M. L. Daviglus et al., "Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies," *Circulation*, vol. 109, no. 22, pp. 2705–2711, 2004.

[26] A. Messori, V. Fadda, D. Maratea, and S. Trippoli, "ω-3 fatty acid supplements for secondary prevention of cardiovascular disease: from "no proof of effectiveness" to 'proof of no effectiveness'," *JAMA Internal Medicine*, vol. 173, no. 15, pp. 1466–1468, 2013.

[27] S. M. Kwak, S.-K. Myung, Y. J. Lee, and H. G. Seo, "Efficacy of omega-3 fatty acid supplements (eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) in the secondary prevention of cardiovascular disease: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials," *Archives of Internal Medicine*, vol. 172, no. 9, pp. 686–694, 2012.

[28] R. Marchioli, "Dietary supplementation with N-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial," *The Lancet*, vol. 354, no. 9177, pp. 447–455, 1999.

[29] M. Yokoyama, H. Origasa, M. Matsuzaki et al., "Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis," *The Lancet*, vol. 369, no. 9567, pp. 1090–1098, 2007.

[30] R. M. Krauss, R. H. Eckel, B. Howard et al., "AHA Dietary Guidelines Revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association," *Circulation*, vol. 102, no. 18, pp. 2284–2299, 2000.

[31] N. J. Stone, "Fish consumption, fish oil, lipids, and coronary heart disease," *Circulation*, vol. 94, no. 9, pp. 2337–2340, 1996.

[32] P. M. Kris-Etherton, W. S. Harris, and L. J. Appel, "Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease," *Circulation*, vol. 106, no. 21, pp. 2747–2757, 2002.

[33] J. C. Stanley, R. L. Elsom, P. C. Calder et al., "UK Food Standards Agency Workshop Report: the effects of the dietary n-6:n-3 fatty acid ratio on cardiovascular health," *British Journal of Nutrition*, vol. 98, no. 6, pp. 1305–1310, 2007.

[34] A. P. Simopoulos, "Overview of evolutionary aspects of omega 3 fatty acids in the diet," *World Review of Nutrition and Dietetics*, vol. 83, pp. 1–11, 1998.

[35] D. Rodriguez-Leyva, C. M. C. Bassett, R. McCullough, and G. N. Pierce, "The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid," *Canadian Journal of Cardiology*, vol. 26, no. 9, pp. 489–496, 2010.

[36] J.-M. Bourre, "Where to find omega-3 fatty acids and how feeding animals with diet enriched in omega-3 fatty acids to increase nutritional value of derived products for human: what

is actually useful?" *Journal of Nutrition, Health and Aging*, vol. 9, no. 4, pp. 232–242, 2005.

[37] G. Barceló-Coblijn and E. J. Murphy, "Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels," *Progress in Lipid Research*, vol. 48, no. 6, pp. 355–374, 2009.

[38] J. T. Brenna, N. Salem Jr., A. J. Sinclair, and S. C. Cunnane, "α-linolenic acid supplementation and conversion to n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in humans," *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 80, no. 2-3, pp. 85–91, 2009.

[39] W. E. Connor, "Importance of n-3 fatty acids in health and disease," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 71, supplement 1, pp. 171S–175S, 2000.

[40] D. Richard, P. Bausero, C. Schneider, and F. Visioli, "Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 66, no. 20, pp. 3277–3288, 2009.

[41] C. R. Harper, M. C. Edwards, and T. A. Jacobson, "Flaxseed oil supplementation does not affect plasma lipoprotein concentration or particle size in human subjects," *Journal of Nutrition*, vol. 136, no. 11, pp. 2844–2848, 2006.

[42] C. R. Harper, M. J. Edwards, A. P. DeFilipis, and T. A. Jacobson, "Flaxseed oil increases the plasma concentrations of cardioprotective (n-3) fatty acids in humans," *Journal of Nutrition*, vol. 136, no. 1, pp. 83–87, 2006.

[43] F. Fuentes, J. López-Miranda, P. Pérez-Martínez et al., "Chronic effects of a high-fat diet enriched with virgin olive oil and a low-fat diet enriched with α-linolenic acid on postprandial endothelial function in healthy men," *British Journal of Nutrition*, vol. 100, no. 1, pp. 159–165, 2008.

[44] J. H. Christensen, M. S. Christensen, E. Toft, J. Dyerberg, and E. B. Schmidt, "α-linolenic acid and heart rate variability," *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, vol. 10, no. 2, pp. 57–61, 2000.

[45] C. R. Harper and T. A. Jacobson, "Usefulness of omega-3 fatty acids and the prevention of coronary heart disease," *The American Journal of Cardiology*, vol. 96, no. 11, pp. 1521–1529, 2005.

[46] M. De Lorgeril, S. Renaud, N. Mamelle et al., "Mediterranean alpha-linolenic acid-rich diet in secondary prevention of coronary heart disease," *The Lancet*, vol. 343, no. 8911, pp. 1454–1459, 1994.

[47] M. de Lorgeril, P. Salen, J.-L. Martin, I. Monjaud, J. Delaye, and N. Mamelle, "Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study," *Circulation*, vol. 99, no. 6, pp. 779–785, 1999.

[48] F. B. Hu, M. J. Stampfer, J. E. Manson et al., "Dietary intake of α-linolenic acid and risk of fatal ischemic heart disease among women," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 69, no. 5, pp. 890–897, 1999.

[49] E. Wendland, A. Farmer, P. Glasziou, and A. Neil, "Effect of α linolenic acid on cardiovascular risk markers: a systematic review," *Heart*, vol. 92, no. 2, pp. 166–169, 2006.

[50] D. Richard, K. Kefi, U. Barbe, P. Bausero, and F. Visioli, "Polyunsaturated fatty acids as antioxidants," *Pharmacological Research*, vol. 57, no. 6, pp. 451–455, 2008.

[51] E. Vericel, A. Polette, S. Bacot, C. Calzada, and M. Lagarde, "Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets," *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 1, no. 3, pp. 566–572, 2003.

[52] T. A. Mori and L. J. Beilin, "Omega-3 fatty acids and inflammation," *Current Atherosclerosis Reports*, vol. 6, no. 6, pp. 461–467, 2004.

[53] F. M. van der Valk, D. F. van Wijk, and E. S. G. Stroes, "Novel anti-inflammatory strategies in atherosclerosis," *Current Opinion in Lipidology*, vol. 23, no. 6, pp. 532–539, 2012.

[54] J. de Goede, W. M. M. Verschuren, J. M. A. Boer, D. Kromhout, and J. M. Geleijnse, "Alpha-linolenic acid intake and 10-year incidence of coronary heart disease and stroke in 20,000 middle-aged men and women in the Netherlands," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 3, Article ID e17967, 2011.

[55] M. A. Moskowitz, E. H. Lo, and C. Iadecola, "The science of stroke: mechanisms in search of treatments," *Neuron*, vol. 67, no. 2, pp. 181–198, 2010.

[56] N. Blondeau, O. Pétrault, S. Manta et al., "Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel," *Circulation Research*, vol. 101, no. 2, pp. 176–184, 2007.

[57] N. Blondeau, C. Widmann, M. Lazdunski, and C. Heurteaux, "Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance," *Neuroscience*, vol. 109, no. 2, pp. 231–241, 2002.

[58] C. Heurteaux, N. Guy, C. Laigle et al., "TREK-1, a K+ channel involved in neuroprotection and general anesthesia," *The EMBO Journal*, vol. 23, no. 13, pp. 2684–2695, 2004.

[59] C. Heurteaux, C. Laigle, N. Blondeau, G. Jarretou, and M. Lazdunski, "Alpha-linolenic acid and riluzole treatment confer cerebral protection and improve survival after focal brain ischemia," *Neuroscience*, vol. 137, no. 1, pp. 241–251, 2006.

[60] L. Lang-Lazdunski, N. Blondeau, G. Jarretou, M. Lazdunski, and C. Heurteaux, "Linolenic acid prevents neuronal cell death and paraplegia after transient spinal cord ischemia in rats," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 38, no. 3, pp. 564–575, 2003.

[61] I. Lauritzen, N. Blondeau, C. Heurteaux, C. Widmann, G. Romey, and M. Lazdunski, "Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors," *The EMBO Journal*, vol. 19, no. 8, pp. 1784–1793, 2000.

[62] Y. F. Xiao, S. N. Wright, G. K. Wang, J. P. Morgan, and A. Leaf, "Fatty acids suppress voltage-gated Na^+ currents in HEK293t cells transfected with the α-subunit of the human cardiac Na^+ channel," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, no. 5, pp. 2680–2685, 1998.

[63] J. A. Simon, J. Fong, J. T. Bernert Jr., and W. S. Browner, "Serum fatty acids and the risk of stroke," *Stroke*, vol. 26, no. 5, pp. 778–782, 1995.

[64] L. Djoussé, S. C. Hunt, D. K. Arnett, M. A. Province, J. H. Eckfeldt, and R. C. Ellison, "Dietary linolenic acid is inversely associated with plasma triacylglycerol: the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 78, no. 6, pp. 1098–1102, 2003.

[65] M. Fink, F. Lesage, F. Duprat et al., "A neuronal two P domain K+ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids," *The EMBO Journal*, vol. 17, no. 12, pp. 3297–3308, 1998.

[66] J. S. Tauskela and N. Blondeau, "Prescription for stroke: should preconditioning be investigated as a drug?" in *Ischemic Tolerance of the Brain, Research Signpost*, B. J. Schaller, Ed., pp. 85–135, Research Signpost, Kerala, India, 2009.

[67] M. M. Hofer and Y.-A. Barde, "Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death in vivo," *Nature*, vol. 331, no. 6153, pp. 261–262, 1988.

[68] J. Lee, W. Duan, and M. P. Mattson, "Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis

and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice," *Journal of Neurochemistry*, vol. 82, no. 6, pp. 1367–1375, 2002.

[69] B. Lu and A. Figurov, "Role of neurotrophins in synapse development and plasticity," *Reviews in the Neurosciences*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, 1997.

[70] A. M. Marini, X. Jiang, X. Wu et al., "Preconditioning and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli," *Amino Acids*, vol. 32, no. 3, pp. 299–304, 2007.

[71] M. P. Mattson, W. Duan, and Z. Guo, "Meal size and frequency affect neuronal plasticity and vulnerability to disease: cellular and molecular mechanisms," *Journal of Neurochemistry*, vol. 84, no. 3, pp. 417–431, 2003.

[72] Q. Yan, R. D. Rosenfeld, C. R. Matheson et al., "Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system," *Neuroscience*, vol. 78, no. 2, pp. 431–448, 1997.

[73] D. D. Mosser, A. W. Caron, L. Bourget et al., "The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 20, no. 19, pp. 7146–7159, 2000.

[74] P. C. Calder, "Mechanisms of action of (n-3) fatty acids," *Journal of Nutrition*, vol. 142, no. 3, pp. 592S–599S, 2012.

[75] A. H. Nagahara and M. H. Tuszynski, "Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 10, no. 3, pp. 209–219, 2011.

[76] Y. Jiang, N. Wei, T. Lu, J. Zhu, G. Xu, and X. Liu, "Intranasal brain-derived neurotrophic factor protects brain from ischemic insult via modulating local inflammation in rats," *Neuroscience*, vol. 172, pp. 398–405, 2011.

[77] H. D. Müller, K. M. Hanumanthiah, K. Diederich, S. Schwab, W.-R. Schäbitz, and C. Sommer, "Brain-derived neurotrophic factor but not forced arm use improves long-term outcome after photothrombotic stroke and transiently upregulates binding densities of excitatory glutamate receptors in the rat brain," *Stroke*, vol. 39, no. 3, pp. 1012–1021, 2008.

[78] E. Larsson, A. Nanobashvili, Z. Kokaia, and O. Lindvall, "Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 19, no. 11, pp. 1220–1228, 1999.

[79] W. R. Schabitz, S. Schwab, M. Spranger, and W. Hacke, "Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 17, no. 5, pp. 500–506, 1997.

[80] W.-R. Schabitz, C. Sommer, W. Zoder et al., "Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia," *Stroke*, vol. 31, no. 9, pp. 2212–2217, 2000.

[81] D. Wu, "Neuroprotection in experimental stroke with targeted neurotrophins," *NeuroRx*, vol. 2, no. 1, pp. 120–128, 2005.

[82] N. Blondeau, C. Nguemeni, D. N. Debruyne et al., "Subchronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke," *Neuropsychopharmacology*, vol. 34, no. 12, pp. 2548–2559, 2009.

[83] C. Capone, S. Frigerio, S. Fumagalli et al., "Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment," *PLoS ONE*, vol. 2, no. 4, article e373, 2007.

[84] S. Maysami, J. Q. Lan, M. Minami, and R. P. Simon, "Proliferating progenitor cells: a required cellular element for induction of ischemic tolerance in the brain," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 28, no. 6, pp. 1104–1113, 2008.

[85] Y. Moriyama, N. Takagi, and K. Tanonaka, "Intravenous injection of neural progenitor cells improved depression-like behavior after cerebral ischemia," *Translational Psychiatry*, vol. 1, article e29, 2011.

[86] T. Nomura, O. Honmou, K. Harada, K. Houkin, H. Hamada, and J. D. Kocsis, "I.V. infusion of brain-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat," *Neuroscience*, vol. 136, no. 1, pp. 161–169, 2005.

[87] R. Pallini, L. R. Vitiani, A. Bez et al., "Homologous transplantation of neural stem cells to the injured spinal cord of mice," *Neurosurgery*, vol. 57, no. 5, pp. 1014–1024, 2005.

[88] B. Fure, T. B. Wyller, K. Engedal, and B. Thommessen, "Emotional symptoms in acute ischemic stroke," *International Journal of Geriatric Psychiatry*, vol. 21, no. 4, pp. 382–387, 2006.

[89] M. Lucas, F. Mirzaei, E. J. O'Reilly et al., "Dietary intake of n-3 and n-6 fatty acids and the risk of clinical depression in women: a 10-y prospective follow-up study," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 93, no. 6, pp. 1337–1343, 2011.

[90] J. R. Hibbeln, "Fish consumption and major depression," *The Lancet*, vol. 351, no. 9110, p. 1213, 1998.

[91] M. Peet, B. Murphy, J. Shay, and D. Horrobin, "Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients," *Biological Psychiatry*, vol. 43, no. 5, pp. 315–319, 1998.

[92] M. Peet and C. Stokes, "Omega-3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders," *Drugs*, vol. 65, no. 8, pp. 1051–1059, 2005.

[93] V. R. Venna, D. Deplanque, C. Allet, K. Belarbi, M. Hamdane, and R. Bordet, "PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus," *Psychoneuroendocrinology*, vol. 34, no. 2, pp. 199–211, 2009.

[94] D. Soppet, E. Escandon, J. Maragos et al., "The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor," *Cell*, vol. 65, no. 5, pp. 895–903, 1991.

[95] E. Koponen, T. Rantamaki, V. Voikar, T. Saarelainen, E. MacDonald, and E. Castren, "Enhanced BDNF signaling is associated with an antidepressant-like behavioral response and changes in brain monoamines," *Cellular and Molecular Neurobiology*, vol. 25, no. 6, pp. 973–980, 2005.

[96] I. A. Kerman, "New insights into BDNF signaling: relevance to major depression and antidepressant action," *American Journal of Psychiatry*, vol. 169, no. 11, pp. 1137–1140, 2012.

[97] A. T. Michael-Titus, "Omega-3 fatty acids and neurological injury," *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, vol. 77, no. 5-6, pp. 295–300, 2007.

[98] A. R. Heller, S. Rössler, R. J. Litz et al., "Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome," *Critical Care Medicine*, vol. 34, no. 4, pp. 972–979, 2006.

[99] A. Martin, "The "apports nutritionnels conseilles (ANC)" for the French population," *Reproduction Nutrition Development*, vol. 41, no. 2, pp. 119–128, 2001.

Neuropharmacology 108 (2016) 60–72

Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm

Alpha-linolenic acid given as enteral or parenteral nutritional intervention against sensorimotor and cognitive deficits in a mouse model of ischemic stroke

Miled Bourourou [a, b], Catherine Heurteaux [a, b], Nicolas Blondeau [a, b, *]

[a] Université de Nice Sophia Antipolis, IPMC, Sophia Antipolis, F-06560, France
[b] CNRS, IPMC, Sophia Antipolis, F-06560, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 February 2016
Received in revised form
26 April 2016
Accepted 27 April 2016
Available online 29 April 2016

Chemical compounds:
Alpha-linolenic acid
Linolenic acid
Linolenate (PubChem CID 5280934)
Docosahexaenoic acid (PubChem CID 445580)
Eicosapentaenoic acid (PubChem CID 446284)

Keywords:
Disease modifiers
Nutraceutical
Nutrition
Polyunsaturated fatty acids
Neuroprotection
Stroke outcome and recovery

ABSTRACT

Stroke is a leading cause of disability and death worldwide. Numerous therapeutics applied acutely after stroke have failed to improve long-term clinical outcomes. An emerging direction is nutritional intervention with omega-3 polyunsaturated fatty acids acting as disease-modifying factors and targeting post-stroke disabilities. Our previous studies demonstrated that the omega-3 precursor, alpha-linolenic acid (ALA) administrated by injections or dietary supplementation reduces stroke damage by direct neuroprotection, and triggering brain artery vasodilatation and neuroplasticity. Successful translation of putative therapies will depend on demonstration of robust efficacy on common deficits resulting from stroke like loss of motor control and memory/learning. This study evaluated the value of ALA as adjunctive therapy for stroke recovery by comparing whether oral or intravenous supplementation of ALA best support recovery from ischemia. Motor and cognitive deficits were assessed using rotarod, pole and Morris water maze tests. ALA supplementation in diet was better than intravenous treatment in improving motor coordination, but this improvement was not due to a neuroprotective effect since infarct size was not reduced. Both types of ALA supplementation improved spatial learning and memory after stroke. This cognitive improvement correlated with higher survival of hippocampal neurons. These results support clinical investigation establishing therapeutic plans using ALA supplementation.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

1. Introduction

Annually, 15 million people worldwide suffer a stroke. Of these, 30% die and another 30% are left permanently disabled, placing a tremendous burden on family and community. A stroke occurs on average every 40 and 90 s, in the United States and Europe, respectively (Go et al., 2014; Gustavsson et al., 2011). The estimated cost of stroke for 2010 was approximately $74 billion and €64 billion, respectively (Gustavsson et al., 2011; Lloyd-Jones et al., 2010). Apart for thrombolysis – for which inclusion criteria are fairly restrictive - clinical trials for the treatment of acute ischemic stroke have been almost all unsuccessful, leaving patients with an extremely limited repertoire of therapeutic opportunities.

Nevertheless, improvements in population health – particularly in the control of major risk factors of stroke such as hypertension, diabetes, high cholesterol levels and smoking - over the past decades have contributed to reduced stroke mortality. Unfortunately, stroke remains a substantial problem, since mortality represents, at best, a third of annual first-ever strokes. Indeed, in 2007 the

Abbreviations: ALA, alpha-linolenic acid; CA, *Cornu Ammonis*; DAB, 3,3′-diaminobenzidine; DALYs, disability-adjusted life years; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; H/I, hypoxic–ischemic; LC-omega-3, long chain omega-3; MCA, middle cerebral artery; MCAo, middle cerebral artery occlusion; MWM, Morris water-maze; NeuN, neuronal nuclei; NIH, National Institutes of Health; PBS, phosphate-buffered saline; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; rTMS, repetitive transcranial magnetic stimulation; SNAP 25, soluble synaptosomal-associated protein of 25 kDa; TPN, total parenteral nutrition; U.S., United States.

* Corresponding author. Institut de Pharmacologie Moléculaires et Cellulaires, UMR7275, C.N.R.S, F-06560, Valbonne, France.
E-mail address: Blondeau@ipmc.cnrs.fr (N. Blondeau).

http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.04.040
0028-3908/© 2016 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

number of stroke survivors was evaluated to be 62 million, and 30–60% of these were estimated to be dependent in some aspect of daily living. These survivors have a high level of disability with more than 50% of patients being left with a residual motor or cognitive/amnesic deficit. Stroke burden was calculated to be approximately 51 million disability-adjusted life years [DALYs] (Johnston et al., 2009; Strong et al., 2007). Therefore, reducing long-term disability by improving recovery would have a substantial impact.

The major stroke-induced impairments are motor and cognitive deficits. Motor impairment is characterized by a loss or limitation of function in muscle control or a limitation in mobility (walking/gaiting) (Jorgensen et al., 1995). In 80% of patients, altered control of the face, arm, and leg of one body side are described as typical symptoms of stroke (Langhorne et al., 2009). Cognitive impairment affects multiple domains, including attention, executive function, visuo-spatial ability, memory and language. As well, focal disorders such as aphasia and neglect are common, as are more diffuse abnormalities such as reduced information processing and executive dysfunction (Cumming et al., 2013).

Confronted with a lack of treatment options, various strategies have been developed to enhance motor recovery, ranging from pharmacological agents prescribed against hypertension, depression or Alzheimer disease, to exercise training (treadmill …) and even to repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) (Calautti and Baron, 2003; Cramer, 2008; Langhorne et al., 2011). Increasing physical activity and rTMS are also known to improve cognition (Cumming et al., 2013). In cognitive and memory post-stroke rehabilitation, the efficiency of task-specific training remains uncertain mainly due to a paucity of studies (Lincoln et al., 2000; Nair and Lincoln, 2007). Interestingly, most of the motor and cognitive rehabilitation approaches have been shown retrospectively to target neural plasticity and to increase levels of neurotropic factors in the brain (Di Pino et al., 2014; Johansson, 2011).

An emerging preclinical concept to support the recovery of body and brain after stroke is nutrition. Nevertheless how nutrition may affect stroke recovery has not yet been intensely investigated, which is surprising given its great influence as risk factor (Hankey, 2012). Most interventions showing that nutrition could improve the recovery of neurocognitive functions in ischemic stroke patients have been based on protein supplementation provided to counteract stroke-induced protein synthesis depression or malnutrition (Aquilani et al., 2010). Apart from supplementation with vitamins, which may reduce oxidative damage after acute ischemic stroke (B and E groups) or have statin-like effects (Vitamin D) nutritional intervention in stroke patients has been investigated to a limited extent (Pilz et al., 2011).

Severe deficiencies identified in omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs), both in the form of alpha-linolenic acid (ALA) and the long chain derivatives eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), stand out as risk factors for cardiovascular and cerebral diseases (Riediger et al., 2009; Kris-Etherton et al., 2002). A body of preclinical studies have documented omega-3 PUFAs supplementation additional benefits in the context of stroke: that as an effective and pleiotropic neuroprotective approach against ischemia (for review (Blondeau and Tauskela, 2013; Gouix et al., 2014; Nguemeni et al., 2013)). As well, fish-oil PUFAs supplemented in diet prior to ischemia was also found exerting a beneficial effect on spatial memory deficits that was not correlated with any benefit in hippocampal neurons survival suggesting that PUFAs may also promote stroke recovery (Plamondon and Roberge, 2008). During the last decade, we identified pleiotropic abilities of ALA to trigger multi-cellular and mechanistically diverse responses, resulting in neuronal protection from stroke (see: (Blondeau, 2016; Blondeau et al., 2015; Blondeau and Tauskela, 2013; Nguemeni et al., 2013)). In a mouse model of stroke, a subchronic post-treatment consisting of three sequential injections of ALA enhanced animal survival rates by three-fold, ten days following ischemia (Blondeau et al., 2009c). Several clinical studies indicated that i.v. perfusion of long chain PUFAs, delivered as parenteral supplementation with a 10% fish oil emulsion (Omegaven, Fresenius-Kabi), may reduce mortality, antibiotic use, and length of hospital stay in different diseases (Heller et al., 2002, 2006). While it seems intuitive that beneficial effects related to fish oil doses may be reliant on the pathology phenotype, it was tempting to speculate some value of omega-3 fatty acid as adjunctive therapy for stroke recovery. ALA supplementation either as an i.v. treatment or as enriched-diet also enhances brain plasticity and improves neurite growth and remodeling in hippocampal neurons (a main site for memory formation) (Blondeau et al., 2009a; Venna et al., 2009), suggesting that ALA may represent an excellent nutraceutical strategy to promote post-stroke recovery.

To provide insight into the potential of ALA on post-stroke rehabilitation, we explored whether ALA supplementation delivered by i.v. subchronic treatment or modification of the daily diet could facilitate recovery of motor and cognitive functions after stroke in the 30 min MCAo model (which has been described as the gold standard for characterization of long-term function in mice (Balkaya et al., 2013)). We first evaluated the effect of the ALA supplementation on the ischemic brain lesion and long-term mortality rate. We further determined motor deficits by the rotarod and pole test and cognitive deficits using the Morris Water-Maze test. Finally, we evaluated the effect of ALA supplementation on selective neuronal lesions that are known to important for stroke rehabilitation.

2. Material and methods

2.1. Animals, diets and treatments

Male 4-week old C57BL/6 J mice (Janvier France Breeding) were housed under standardized conditions and received care according to the policies of European Community Directive 86/609/EEC. The Institutional Animal Care and Use Committees (CIEPAL) approved the study (French Authorization N°06-118). Mice were fed a regular rodent diet (SAFE, France) with an ALA concentration of 0.25% (0.25 g in 100 g of regular diet, a proportion matching the "murine" recommended intake (Bourre et al., 1993; Pudelkewicz et al., 1968)) or an experimental diet enriched in ALA by a factor of three compared to regular chows, for 6 weeks. The content of proteins, minerals, micronutrients, vitamins and the metabolizable energy density provided by the different formulations are as previously described (Nguemeni et al., 2010). Briefly, in the ALA enriched diet (ALA-diet) lipids from rapeseed oil accounts for 10% and ALA for 0.75% by weight. The ALA-diet did not contain any EPA or DHA, in contrast to the regular chow. Body weight, and water and food consumption were monitored through the entire experiments (Nguemeni et al., 2010). With respect to parenteral supplementation (ALA, Enzo Life Sciences), animals were injected in the penil vein 2 h, 3 d, 7 d, 10 d, 14 d, 17 d and 21 d after the occlusion of the middle cerebral artery (MCAo). The timing and dose (500 nmol/kg as a bolus of 50 μl) selected for sequential injections of ALA were based on our previous studies in the mouse model of focal ischemia induced by a longer duration of MCAo (Blondeau et al., 2009c; Heurteaux et al., 2006).

2.2. Middle cerebral artery occlusion

Focal ischemia was induced by a 30 min of transitory MCAo

using an intraluminal filament technique (Blondeau et al., 2009b; Nguemeni et al., 2010). Cerebral blood flow measurements by laser Doppler flowmetry (Perimed, Craponne, France) confirmed an ischemic occlusion (reduced by 85% of baseline) during MCAo and restoration of blood flow during reperfusion, conditions required for mice being included in the study. Physiological parameters, including weight and survival rate were assessed (Nguemeni et al., 2010).

2.3. Evaluation of brain ischemic lesions

The infarct volume was determined 24 h after MCAo on coronal frozen brain sections stained using a solution of 1% cresyl violet in 0.25% acetic acid. The striatal and cortical areas of infarction were measured on each section using a computer image analysis system and corrected for brain edema according (Golanov and Reis, 1995). Infarct volume (in mm^3) was calculated by a linear integration of the corrected lesion areas (Blondeau et al., 2009b; Nguemeni et al., 2010). Late infarct consolidation was assessed 21 days post-stroke by NeuN (neuronal nuclei) immunohistochemistry. Briefly, brain sections were incubated overnight with anti-NeuN antibodies (mouse monoclonal, 1:200; Chemicon) and a 3-stage avidin-biotin method with corresponding biotinylated secondary antibody. NeuN expression was visualized with 3,3′-diaminobenzidine (DAB as chromogene). NeuN-positive cells were counted in the cortex and striatum, including the caudate-putamen area at the level of the lesion (bregma level 0.3 mm; magnification × 40) (Blondeau et al., 2009b; Heurteaux et al., 2006; Nguemeni et al., 2010). Data were expressed as number of NeuN-positive cells per mm^2.

In a separate group of mice, we blindly assessed cellular status at 3 weeks post-MCAo. Tissue characteristics were quantified by measuring ipsilateral and contralateral hemispheric volumes and calculating tissue loss and atrophy using coronal cryosections stained with cresyl violet (Lee et al., 2014). Calculations of neuronal density of hippocampal CA1, CA2 and CA3 (*Cornu Ammonis*) subfields were evaluated on coronal sections of the dorsal hippocampus stained with cresyl violet, corresponding to brain sections located between 1.46 and 2.18 mm posterior to bregma. The number of living neurons in the stratum pyramidal within the CA1, CA2 and CA3 area (μm^2 measured with a digitizer) was counted using a Leica DMD108 microscope.

2.4. Behavioral tests

2.4.1. Rotarod

The rotarod test has been reported to be effective for evaluating motor coordination and balance alterations after MCAo in rodent (Rogers et al., 1997). The rotarod apparatus (Ugo Basile, France) consists of a striated rod (diameter 3 cm) subdivided into 5 areas of 5 cm width by disks 25 cm in diameter. The days preceding the day of surgery, mice were trained on the rotarod for 5 min at a constant speed (4 rpm) that was followed by a single trial on the rotarod accelerating from 4 to 40 rpm over a period of 10 min (maximal scores at 10 min) after 30 min rest. The latency of mice to fall from the rotarod was recorded and this score was considered as the baseline (pre-operative score). Mice were tested during the first week post-stroke at Day 2, 3, 4, 7, to detect the effect of ALA supplementation on motor deficits (Fig. 2). Rotarod test was also carried out at Day 10, 14 and 21 post-MCAo to confirm the occurrence of spontaneous recovery of motor impairments (Freret et al., 2011), when the effect of ALA supplementation on spatial memory using the Morris water-maze task was studied (data not shown).

2.4.2. Pole test

The vertical pole test is a motor task reported to be effective for evaluating motor coordination, forelimb strength, and ability to grasp and balance in MCAo mice (Ji et al., 2009; Matsuura et al., 1997). A vertical wood pole of 50 cm was covered with tape to create a rough surface. The animal was placed with the head facing upward near the top of the pole. The time taken to make a complete U-turn downward (time to turn) and the total time to touch the ground with all four paws were recorded. If unable to turn completely, the time to reach the ground was also included in the time to turn. Each animal was tested over 5 trials and the average score was recorded as the final pole test score.

2.4.3. Morris Water-Maze (MWM) test

The water-maze test is a spatial memory task reported to be effective for evaluating learning and memory deficits after MCAo. Experiments were closely adapted from previously published protocols with minor modifications (Quintard et al., 2011; Winter et al., 2004). A 120-cm-diameter, 60-cm-high circular swimming pool was filled to a depth of 32 cm with 21 ± 2 °C opaque water. Visible cues were placed on the walls of the pool remained in fixed position throughout experiments. A clear plexiglas platform with a diameter of 11 cm was submerged 1 cm below the water level. Swimming performance (eg, path, speed, latency, distance) was tracked with a computer-based system (ANYmaze, Smart, Bioseb, France). A full experiment had two phases: a learning period (place task) for 4 consecutive days and a probe trial on day 5, two and three weeks after ischemia. Phase 1: for the learning period, each mouse was subjected to four trials a day in a pool divided into four equal hypothetical quadrants. The position of platform was constant throughout the training session, while the starting position on each of the four training trials day was changed (Rehni and Singh, 2012). If a mouse did not find the platform within 60 s, it was guided to the platform. After reaching the platform, mice were allowed to stay there for 30 s. Phase 2: for the probe trial, mice were allowed to swim freely for 60 s in the absence of the platform. The time spent in each quadrant and crosses through the location of the former platform was measured. Absence of visual or motor impairment was controlled without specific visual cues placed around the outside of the tank but a visible platform (identified by an object on the platform). This test was performed the day after the probe trial.

2.5. Lipid extraction and fatty acid analysis

Fatty acids were extracted from cortex samples and analyzed as described previously (Awada et al., 2013). Tissue fatty acid methyl ester peak identification was performed by comparison with peak retention times of a 30-component methyl ester standard (Sigma). The concentration of each fatty acid was determined by calculating the areas of peaks.

2.6. Statistical analysis

Statistics were carried out in GraphPad Prism. Data were expressed as mean ± SEM. Survival curves were compared by log-rank test. Statistical analysis of differences between groups was performed by using unpaired *t*-test or ANOVA. Where F ratios were significant, statistical analyses were extended and post-hoc comparisons were made by using Tukey's test for multiple comparison tests. Pearson correlation analysis was used to study the correlation between the time in target zone and the hippocampal neuronal density. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. ALA dietary supplementation is superior to i.v. treatment in improving motor coordination, but does not correlate with neuronal protection 3 days post-MCAo

During the 3 weeks following a 30 min MCAo, the mortality rate was not influenced by ALA supplementation achieved through diet modification or i.v. subchronic treatment (Fig. 1A and B). Mortality evaluated 7 days post-MCAo was 25% and 16% for mice fed the regular diet and the ALA-diet, respectively, which was not significantly different from the 16% mortality observed when animals were i.v. treated with ALA. Quantitative assessment of infarct volumes 24 h reperfusion after 30 min MCAo revealed that mice fed regular or ALA-diet displayed similar cerebral infarction volumes (29.2 ± 6.4 mm^3 versus 28.8 ± 5.5 mm^3, Fig. 1C). ALA treatment by i.v. subchronic treatment did not influence cerebral infarction induced by 30 min MCAo. The infarct volumes were of 26.7 ± 2.0 mm^3 and 25.5 ± 2.2 mm^3, respectively in the vehicle and ALA treated-group (Fig. 1D).

The percentage change in body weights post-MCAo compared with values recorded immediately prior to undergoing MCAo were used as primary indicators of general well-being. Mice were weighed daily for 7 days post-surgery for the short-term study and

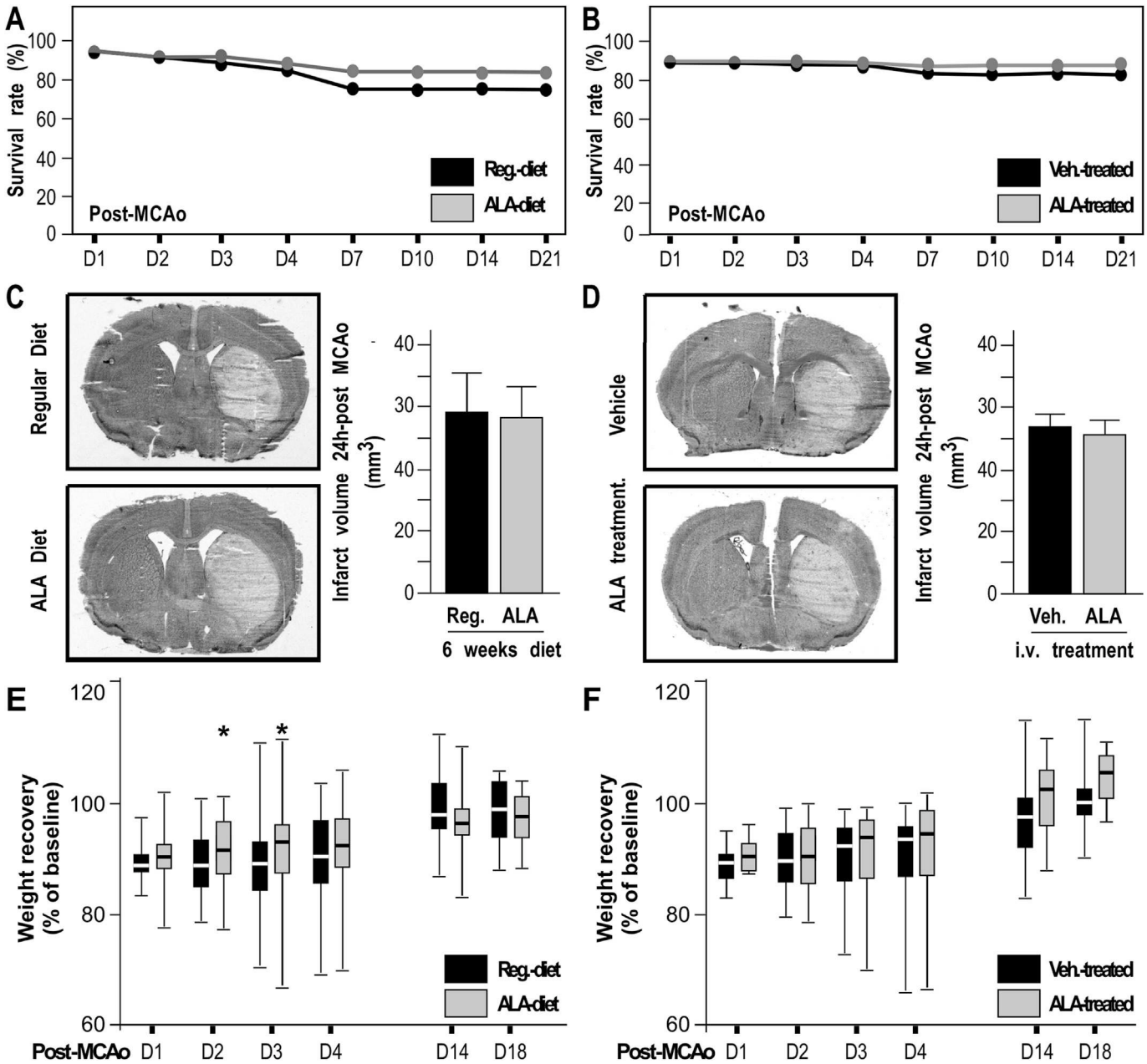


Fig. 1. Effects of α-linolenic acid supplementation on long-term survival, infarct size and body weight after 30 min MCAo. Long-term survival rate after 30 min of MCAo was not affected by ALA supplementation, by modification of the daily diet (**A**) or by i.v. subchronic treatment (**B**), (n = 35, n = 35, n = 30 and n = 28 in the regular diet, ALA-diet, vehicle-treated and ALA-treated groups, respectively). Twenty-four hours after 30 min MCAo, the infarct volume was similar between all groups, showing no effect of the ALA supplementation (**C** and **D**). Data are represented by mean ± SEM (n = 11 per group). (**E** and **F**) During the first week post-MCAo corresponding to the period of motor deficit evaluation, weight loss was lower in animal feds the ALA-diet following 30 min of MACo. During the cognitive deficit evaluation, animals did not differ in weights between each group. Data are represented by boxes, median, and interquartile range; whiskers, min–max; +, mean (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; n > 30 per group; unpaired *t*-test).

at D7, D14 and D18 in the longer-term study. All animals lost weight over the first 2 days post-MCAo (Fig. 1E and F) after which they began to regain weight until reaching their baseline after a week. Interestingly, mice fed the ALA-diet gained weight at a significantly faster rate than mice fed the regular-diet (Fig. 1E), while there was no differences in weight gain between groups treated with subchronic treatment (Fig. 1F). In the longer-term study, weight did not significantly differ between experimental groups 21 days post-MCAo.

To determine whether daily increased intake of ALA improved functional recovery after stroke, mice were preventively fed an ALA-diet for 6 weeks before MCAo. Pre-operative performance in the rotarod test did not differ significantly between animals fed the regular or ALA-diet. As expected, postoperative performance of MCAo animals was significantly impaired (Fig. 2A). Spontaneous recovery from the motor coordination impairment was faster in the group fed the ALA-diet compared to the animals fed the regular diet (Fig. 2A). The post-MCAo performance of animals fed the ALA-diet was significantly improved by an average of 30% during the first week of recovery (2 W ANOVA: effect of group: $F = 21.53$, $\$\$\$p = 0.00001$). Single time-point analysis showed significant improvement in the performances on the rotarod in MCAo-mice fed the ALA-diet as compared to animals fed the regular diet ($^{*}p < 0.05$, Fig. 2A). Compared to their pre-injury baseline on post-MCAo day 2, 3, and 4, mice fed the ALA-diet were able to perform at 69%, 74%, and 100% ($\#\#p < 0.01$, $\#p < 0.05$) while mice fed the regular diet only performed at 50%, 58%, and 76% ($\#\#\#p < 0.001$, $\#\#p < 0.01$ and $\#p < 0.05$), respectively. Surprisingly, the performance of vehicle-treated animals and ALA-treated animals were similar for the rotarod (Fig. 2B). Since the two sequential injections of ALA were insufficient in improving motor recovery, we then explored whether the improvement of motor coordination caused by the ALA-diet would be confirmed in the pole test. Again, when tested before MCAo, no difference was observed in this effect between the different diets. Between day 3–4 post-MCAo, the average performance for the "time to turn" task of animals fed the ALA-diet was significantly improved as compared to animal fed the regular diet (Fig. 2C, RM ANOVA: effect of group: $F = 4.35$, $\$\$p = 0.0397$). Single time-point analysis revealed that mice fed the ALA-diet took less time to finish a complete turn only on day 3 post-MCAo. The time to turn the head downwards was 2.9 ± 0.7 s for the ALA-diet group compared to 6.6 ± 1.8 s for the regular diet group (Fig. 2C, $^{*}p < 0.05$). In the "latency to descend" task, MCAo animals showed significant impairment for 4 days (up to 14 days – not shown) as compared to their pre-operative performance (Fig. 2D), except at day 3 post-stroke for the mice fed the ALA-diet, which is probably correlated with the marked reduction of their time to turn. Overall, the ALA-diet did not have any significant quantitative effects on their rapidity to reach the ground, while the quality of the descent was clearly visually abnormal (falling or slipping down backward) in the group fed the regular diet (data not shown). This predicted that analysis of the mice motion in fine behavioral assessment protocols to discern improvement in the range of motion, grasping and supination from compensation by postural adjustments may reveal improved recovery of the group fed the ALA-diet (Murphy and Corbett, 2009). A detailed analysis of the neural loss confirmed that the improved motor recovery did not correlate with better neuronal survival. Three days post-MCAo, brains of animal fed the ALA and regular diet exhibited a similar subcortical lesion as well as of the caudate putamen of the ipsilateral hemisphere, characterized microscopically by the loss of 26% of the NeuN-positive cells reflecting a marked neuronal destruction (Fig. 2E and F). We further explored whether the disparity in efficiency between dietary supplementation and subchronic treatment extended to cognitive recovery post-stroke.

3.2. ALA supplementation improves spatial learning and memory after MCAo

We first evaluated the effects of an ALA-diet on functional recovery within 3 weeks after ischemic brain injury in a MWM paradigm. The acquisition procedure did not reveal any significant difference between groups in swimming speed (Fig. 3A) or any significant reduction in the distance to find the hidden platform (Fig. 3B). Nonetheless, mice fed the ALA-diet had significantly improved latency to the hidden platform compared with mice fed the regular diet (Fig. 3C), illustrating that the ALA-diet improved learning performance of MCAo mice (2 W ANOVA: effect of group: $F = 10.78$, $\$\$p = 0.0014$). Results of probe trial testing showed that MCAo mice fed the ALA-diet performed significantly better compared with MCAo mice fed the regular diet. During the probe trial, time in the target zone compared to the other three quadrants was highest for mice fed the ALA-diet compared to the regular diet (Fig. 3D, $p < 0.05$). During the 60 s probe trial, the number of platform crossings was significantly different between mice fed the ALA- and regular diet (9.6 ± 2.0 and 3.1 ± 1.4, respectively, $p < 0.05$, Fig. 3E). The ALA-diet group performance was significantly better during both periods (0–30 s and 30–60 s, $p < 0.05$, Fig. 3E). A representative swim pattern of the probe test for each group clearly demonstrated the difference in the search process 18 days post-MCAo (Fig. 3F), whereas both groups exhibited similar performance in visible platform tests (Fig. 3G).

Using the same MWM paradigm to investigate the effect of ALA-treatment on cognitive function, we observed similar levels of improvement using the repeated ALA injections. No difference between the ALA and vehicle-treated group was observed in swimming speeds and distance to find the hidden platform (not shown), but the ALA-treatment displayed improved learning performance (2 W ANOVA: effect of group: $F = 4.96$, $\$p = 0.04$, Fig. 4A). ALA-treated mice spend 25% more time in the target zone (Fig. 4B, $p < 0.05$) compared to the vehicle-treated mice. Again, ALA supplementation positively impacted the search process 18 days post-MCAo (Fig. 4C), while ALA- and vehicle treated groups displayed similar performance in visible platform tests (data not shown).

3.3. The ALA-induced cognitive improvement is supported by an increased survival of neuronal cell of the hippocampus

To determine whether ALA improves cognition, we investigated particular aspects of the brain lesion linked to spatial memory deficit 3 weeks post-MCAo.

At late time points, tissue loss and atrophy are accurate estimations of the maturation of the ischemic lesion. The profound (12%) tissue loss that was observed in the ipsilateral hemisphere of the animals fed the regular diet was not detected in the ipsilateral hemisphere of the animals fed the ALA-diet ($\#, p < 0.05$) (Fig. 5A). A profound (12%) tissue loss was also observed in the ipsilateral hemisphere of the vehicle-injected animal. The atrophy was reduced to 9% in the ALA-treated mice, but did not reach statistical significance (Fig. 5B). As a more straightforward endpoint, we assessed neuronal density of the ipsilateral and contralateral hippocampi. Thirty minutes MCAo induced significant neuronal damage in the hippocampal sector. Compared with their respective contralateral sides, 45% and 30% of hippocampal neurons of animals fed the regular diet and vehicle-treated groups, respectively, were destroyed (not shown). An ALA-diet significantly reduced neuronal loss by 42% in the ipsilateral hippocampus compared with regular diet when measured 3 weeks after ischemia (Fig. 5C). Similarly, the ALA subchronic treatment also reduced neuronal loss throughout the different hippocampal layers compared with the vehicle treatment (Fig. 5C). The reduced number of necrotic cells observed

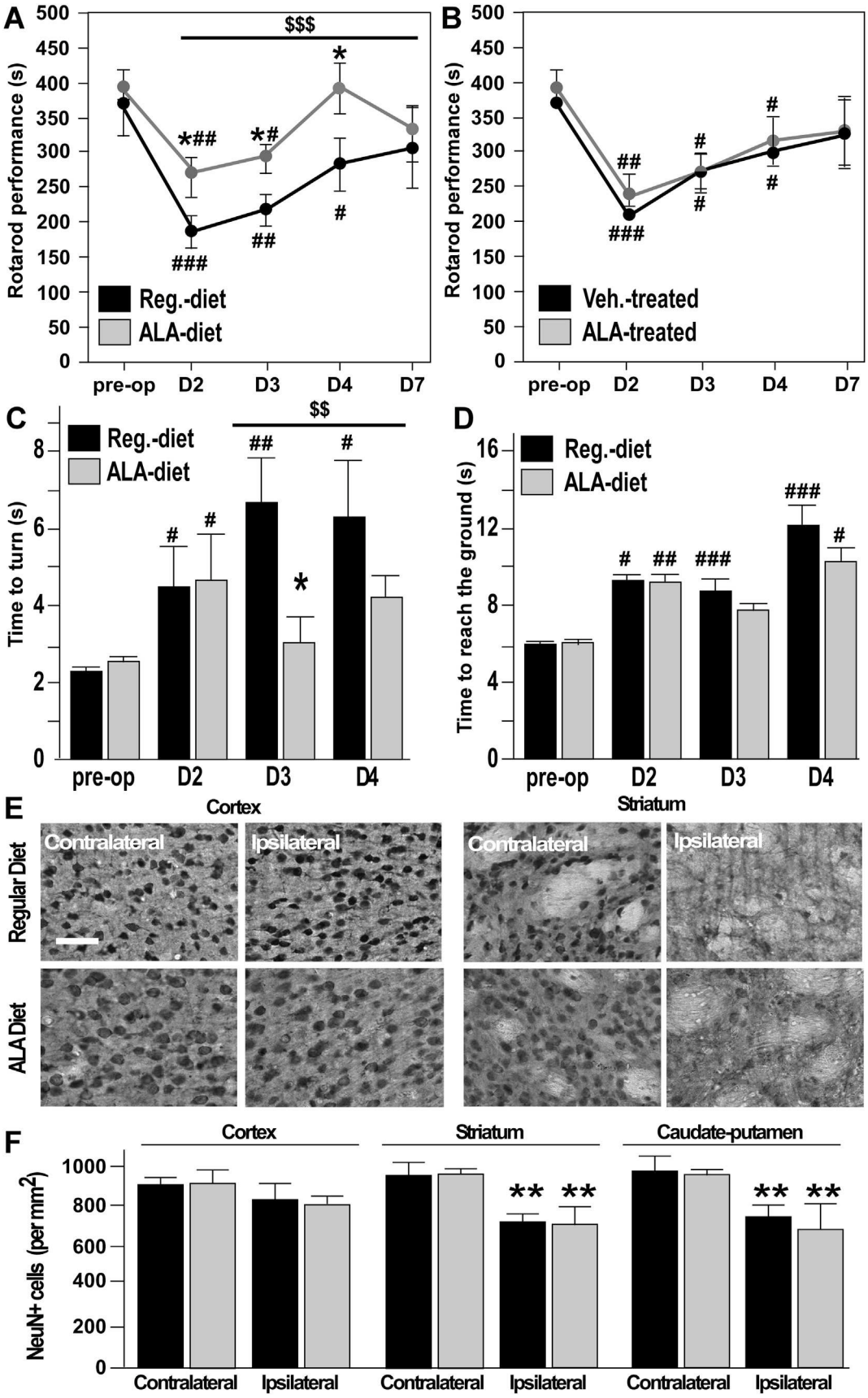


Fig. 2. Effects of α-linolenic acid supplementation on motor deficits and neuronal loss induced by 30 min MCAo. (**A**) Mice fed the ALA-diet displayed better rotarod performance within the first week post-MCAo as compared to mice fed the regular diet. (**B**) The post-MCAo recovery of motor coordination was similar for the mice injected with ALA subchronic treatment or vehicle. Data are represented by mean ± SEM (n = 15 per group at each time point). $^{*}p < 0.05$ versus respective control; $\#p < 0.05$; $\#\#p < 0.01$; $\#\#\#p < 0.001$ versus

in tissue samples obtained from animals treated with the ALA-diet and ALA subchronic treatment is highlighted on photomicrographs shown in Fig. 5D. A correlation between hippocampal neuron loss and time spent in the target zone was observed in the control groups (regular diet and vehicle treated animals), which might explain why ALA-supplemented animals presenting with less hippocampal damage exhibited better spatial memory recovery (Fig. 5E).

In addition, the analysis of cortical content of omega-3 PUFAs indicated that the ALA-diet and a subchronic treatment of 3 sequential ALA injections did not change the content of the major omega-3 fatty acids of the brain, DHA, compared to their respective control (Fig. 5F). No difference was detected between the groups in the overall n-6/n-3 PUFA ratio (Fig. 5G) and the omega-3 PUFA fraction as well as in the proportions of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, and n-6 polyunsaturated fatty acids (Fig. 5H). Altogether, these data suggest the existence of a protective effect of ALA on the different hippocampal layers, which cannot be attributed to a potential bioconversion of ALA to DHA. This sustained neuroprotection into late recovery stage may account for the superior performance in the MWM cognitive test.

4. Discussion

Malnutrition is often observed in stroke patients because of increased metabolic demands due in part to stroke complications (Dennis et al., 2005). Consequently, on this basis alone, a nutritional support should probably lead to improved clinical outcomes. Unfortunately, the effect of such nutritional intervention is still unclear for stroke patients and understudied in preclinical research. The risk for severe deficiency in omega-3 PUFAs, known as risk factors for stroke in the general population, often occurs during post-stroke rehabilitation, while a body of preclinical evidence documents the benefits of ALA supplementation either as an i.v. treatment or as enriched-diet in animal models of stroke (Blondeau, 2016). Therefore we believe that an emerging direction in nutritional intervention post-stroke stands in omega-3 ALA supplementation. Since successful translation of putative therapies will depend on demonstration of robust efficacy on common deficits resulting from stroke like loss of motor control and memory/learning, the central question of this study was to evaluate the influence of nutritional support in omega-3 ALA in a murine model of ischemic stroke. The 30 min MCAo produces a consistent selective lesion (mainly striatal) with a low mortality in mice (Balkaya et al., 2013), thereby allowing characterization of long-term functional outcome. The infarct size and the related striatal damage observed at 2 and 3 days post-MCAo were similar to those described for this short-duration of ischemia (Katchanov et al., 2001; Kilic et al.). In a clinical setting, the choice of nutritional support lies between oral diet supplementation, enteral feeding (for patients who suffer for dysphagia or other feeding difficulties, supplementation can be achieved *via* a nasogastric or percutaneous endoscopic gastrostomy tubing) or intravenous feeding (supplementation is delivered *via* central venous line or by a less invasive option known as peripheral total parenteral nutrition -TPN- *via* peripheral venous line). Interestingly, a neuroprotective effect of ALA has been observed when given by intravenous injection or after a 6-week feeding of an ALA enriched diet in the acute phase of ischemia in several animal models of brain ischemia (Blondeau et al., 2001, 2009c, 2002b; Heurteaux et al., 2006; Lauritzen et al., 2000; Nguemeni et al., 2010). In addition, LC-omega-3 DHA also displayed neuroprotective effects on acute and long-term ischemic brain damage (Belayev et al., 2011), improving functional outcomes up to 5 weeks after neonatal hypoxia/ischemia (Zhang et al., 2010). However the effect of ALA on long-term brain damage and neurological functional recovery was unknown.

In the 30 min MCAo model, where the infarct is mainly striatal, no striking protective effect in reducing the lesion volume and the mortality was detected. This result contrasts with our previous observations in the more stringent model of 60 min MCAo, where robust protection of the cortex was observed (Nguemeni et al., 2010). Indeed, the evolution of loss of striatal neurons was observed in all animal groups, being similar three days post-MCAo between mice feed the ALA-enriched and regular diet. Similarly, the neuroprotective effects of ALA observed with the single or subchronic i.v. treatment in different models of brain ischemia (Blondeau et al., 2002b, 2009c, 2003; Heurteaux et al., 2006; Lauritzen et al., 2000) were not observed with the milder ischemia of 30 min. It is known that the caudate-putamen, which is more damaged by a mild stroke, has inherited motor and cognitive functions (Katchanov et al., 2003), probably due to the interconnections of this structure with several brain regions.

This study highlights the importance of diet supplementation in the loss of body weight after stroke and its link with the recovery of motor functions. While the exact etiology of weight loss after ischemia is not completely understood, cerebral infarction itself clearly represents one major cause. Interestingly, this work shows that the extent of weight loss and the lesion volumes were similar in all groups the first post-operative day. Nevertheless, the time to regain baseline levels (which usually depend on the duration and severity of ischemia) was improved in the animals fed the ALA-diet within the first week post-stroke, which coincides with the spontaneous recovery of motor function. This information is of importance by providing an indication on how animals may better recover from ischemia and even reflect a better prognostic for functional outcome. The weight recovery after MCAo is a good and independent indicator of the animal welfare. Indirectly, it shows the general physiological condition of ischemic mice with an extremely good correlation with clinical observations.

Weight loss after stroke is common even in patients in good physical condition before stroke onset, for whom no less than a quarter also undergo weight loss in the short and long term (Jonsson et al., 2008). It is also associated with poor nutritional status that is considered as a marker of poor outcome after stroke (Collaboration, 2003). Consistent with clinical observations, MCAo-induced weight loss has been associated with poorer recovery of motor function (Dittmar et al., 2003). This could explain why we found that, by comparing the two ALA supplementations, only oral supplementation (achieved through the modification of the daily diet) improved motor recovery post-MCAo, while no dissimilarities were found in infarct size and caudate-putamen lesion. Several studies on basal ganglia dysfunction have implicated the putamen in the control of motor coordination: these include motor learning, motor performance and tasks, motor preparation, specifying

pre-MCAo performance and ($) indicates a group effect ($$$$p < 0.001$). (**C** and **D**) Similar results were obtained in the pole test that only showed an improvement of balance and forelimb strength post-MCAo in mice fed the ALA-diet. Data are represented by mean ± SEM (n = 15 per group at each time point). $^{*}p < 0.05$ versus respective control, $\#p < 0.05$; $\#\#p < 0.01$; $\#\#\#p < 0.001$ versus pre-MCAo performance and ($) indicates a group effect ($$$p < 0.001$). (**E**) Representative photographs of NeuN immunohistochemistry performed 3 days after 30 min MCAo illustrate that neuronal sparing was confined to striatum. (**F**) Quantification of NeuN + cells confirmed that the neuronal loss confined to striatum and caudate-putamen was not averted by consumption of the ALA-diet. This suggests that the improvement in motor function by the ALA-diet is not correlated to any preservation of brain region engaged in motor function. Data are represented by mean ± SEM (n = 6 per group). $^{**}p < 0.001$ versus respective contralateral hemisphere. Scale bar is 50 μm, applicable to all sections.

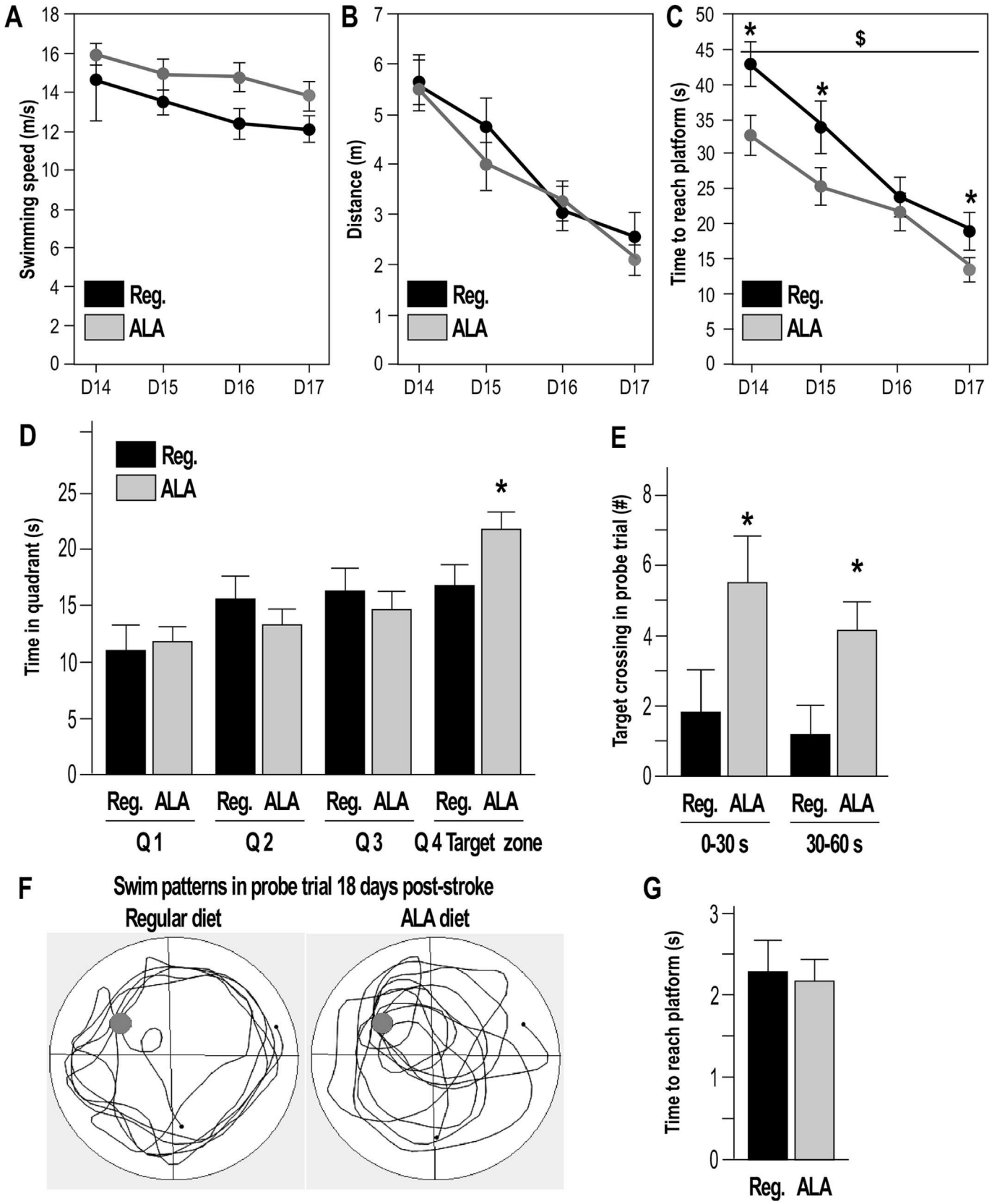


Fig. 3. ALA-Diet improves post-MACo cognitive recovery evaluated by the Morris water-maze test. Between the 14 and 17 days after stroke, while no significant difference were found in the swimming speed (**A**) and the distance traveled (**B**), the time to reach the hidden platform (**C**) of the mice fed the ALA-diet was improved as compared to those fed the regular diet. In addition to displaying a better learning, the mice fed the ALA-diet also showed a better recovery of spatial memory 18 days post-MCAo, as indicated by an increased time spend in the target quadrant (**D**) and number of target crossings than the regular-diet group (**E**). (**F**) Representative swim patterns 18 days post-stroke illustrate the better probe strategy of the mice fed the ALA-diet. (**G**). In the cue test performed the following day after for controlling the absence of visio-motor deficits, the time to reach the visible platform was similar between the mice fed the ALA-and regular diet. Data are represented by mean ± SEM (n = 15 per group). $^{*}p < 0.05$ versus regular diet and ($) indicates a group effect ($\$p < 0.05$) during the learning period.

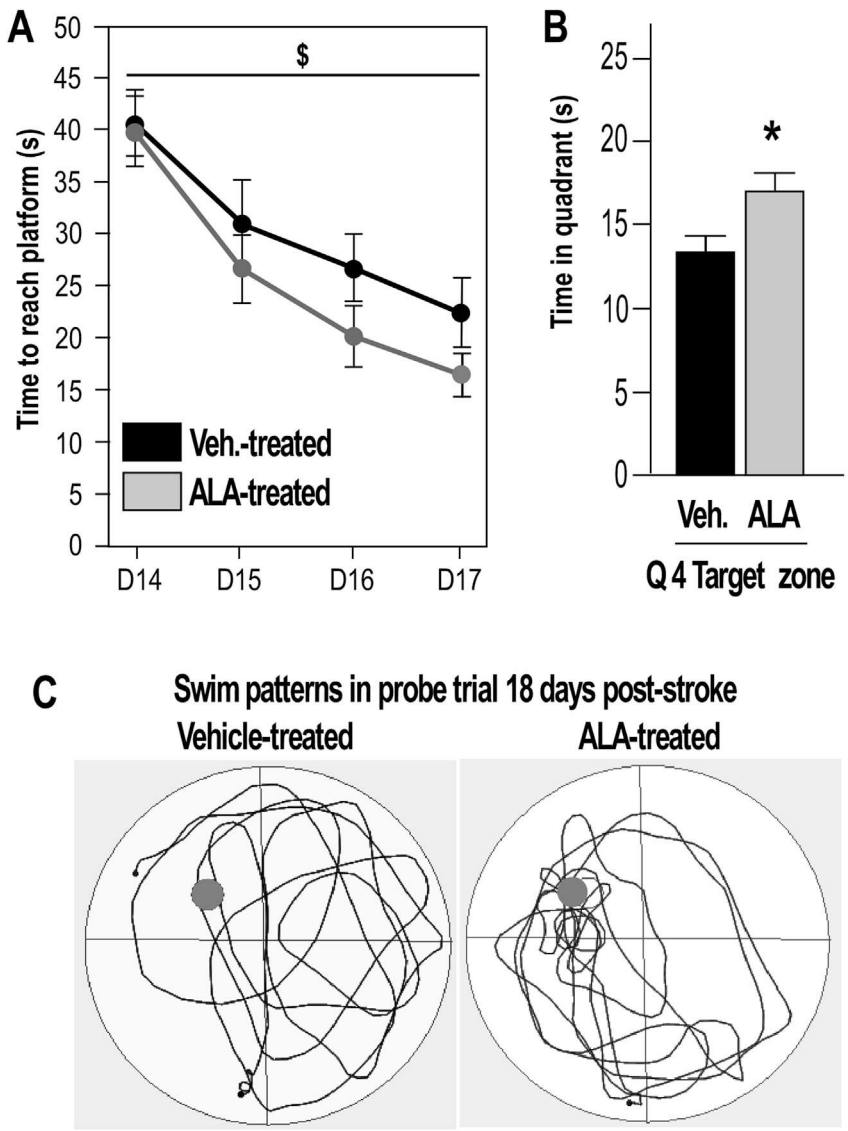


Fig. 4. ALA subchronic i.v. treatment also improves post-MACo cognitive recovery. (**A**) Between the 14 and 17 days after stroke, ALA-subchronic treatment post-MCAo improves the time to reach the hidden platform as compared to vehicle. (**B**) The mice injected with the subchronic treatment also displayed a better recovery of spatial memory 18 days post-MCAo, as indicated by an increased time spent in the target quadrant. (**C**) Representative swim patterns 18 days post-stroke illustrate the better probe strategy of the mice fed the ALA-diet. Data are represented by mean ± SEM (n = 15 per group). $^*p < 0.05$ versus vehicle and ($) indicates a group effect ($\$p < 0.05$) during the learning period.

amplitudes of movement, and movement sequences (Evarts and Wise, 1984; Ward et al.). Nevertheless, in the present study the ischemic damage does not seem to be involved in the difference of motor recovery observed. Although we did not investigate whether post-stroke metabolism was improved by the ALA-diet, it is known that stroke alters a number of metabolic factors and pathways due to a global catabolic/anabolic imbalance. Indeed, the increased catabolic and failing anabolic activities induce the depletion of energy stores leading to muscle functional decline and fat wasting, both of which contribute to the clinical manifestation of weight loss (Gariballa et al., 1998). Indeed, lessons from "the obesity paradox" suggesting that patients who are mildly obese may actually have a better stroke outcome underline the requirement for monitoring changes in body weight and composition after stroke. Treating the catabolic/anabolic imbalance after stroke could significantly improve long-term outcome (Scherbakov et al., 2011). During short periods of insufficient energy supply, the human body will burn primarily free fatty acids from body fat stores, and therefore will use ALA as an energy source. Alpha-linolenic acid is integrally involved in the metabolism and could interact directly with nuclear receptors, such as peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) (Forman et al., 1997), liver X receptor and hepatocyte nuclear factor-4 and therefore be implicated in glucose and lipid homeostasis and for metabolic adaptation (Contreras et al., 2013). Although further studies are required, it is tempting to conclude that post-stroke nutritional support in ALA may be an important and required source of energy and metabolic support that could improve the short-term post-stroke body weight and motor recovery.

Since 30 min MCAo in adult mice not only causes short-term motor deficits but also long-term impairment of the spatial learning and memory, we evaluated the effect of ALA supplementation on spatial memory using the Morris water-maze task at 3 weeks after surgery, a time when MCAo animals display spontaneous recovery of body weight and motor impairment (Freret et al., 2011). Indeed, eventual secondary motor impairments and body

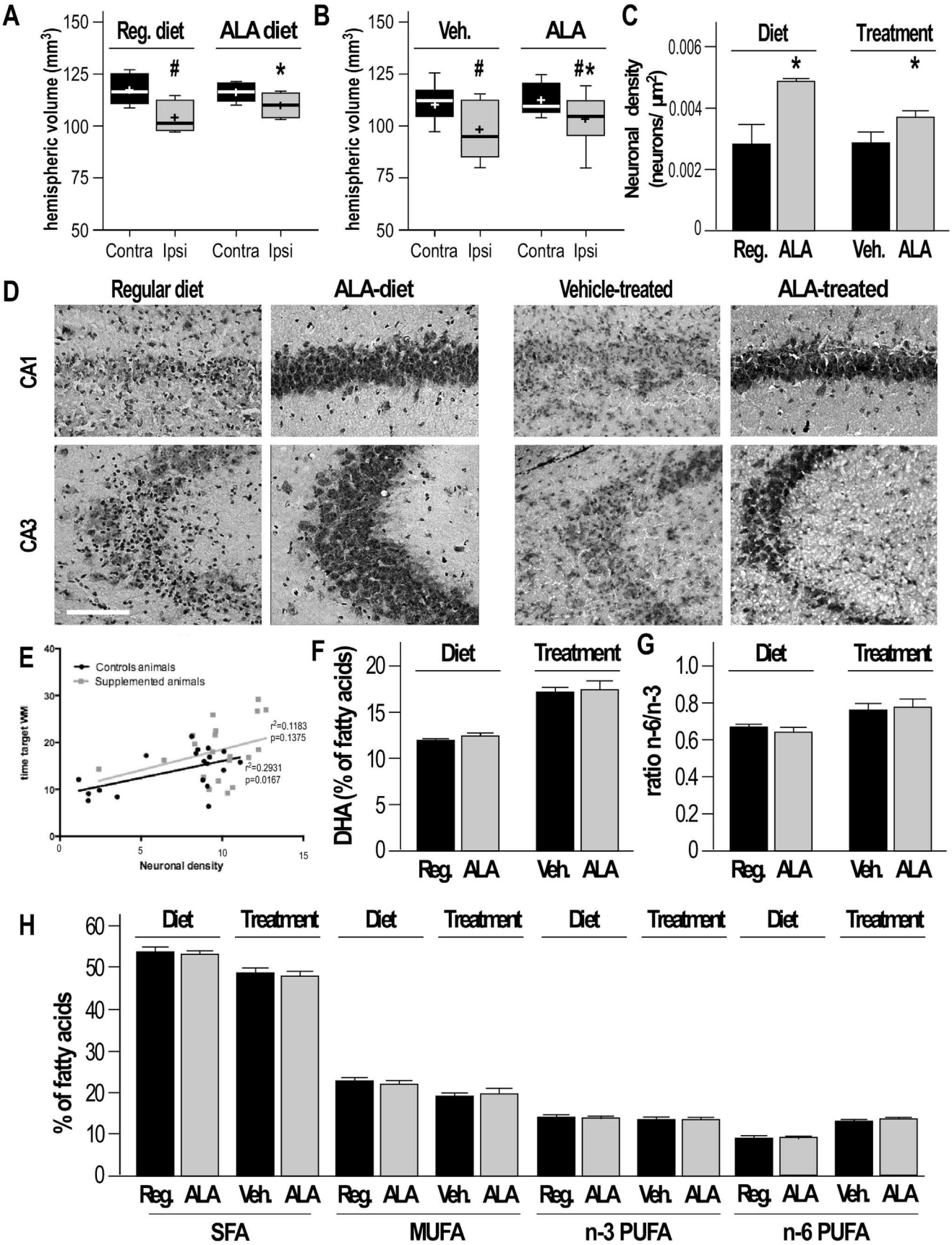


Fig. 5. ALA supplementation reduces parenchymal atrophy and loss of hippocampal neurons. (**A** and **B**) Twenty-one days post-MCAo, analysis of hemispheric volume identified a substantial atrophy of the ipsilateral hemisphere compared to its contralateral in the control groups (e. g. regular diet fed and vehicle treated animals) that was circumvented by ALA supplementation by consumption of ALA-diet or subchronic treatment. Data are represented by Boxes, median, and interquartile range; whiskers, min–max; +, mean (n = 6 per

weight did not influence performance in the water-maze task, as swimming speed did not differ between the different groups before or after MCAo. Nevertheless, ALA-diet fed mice and ALA-injected mice took significantly less time and exhibited optimized searching behaviors to reach the platform compared with the mice fed the regular diet or treated with the vehicle, respectively. These findings demonstrate that nutritional support in omega-3 ALA achieved by oral or intravenous supplementation improves the spontaneous recovery of spatial learning and memory in a mouse model of ischemic stroke.

Because the MWM is known to detect impairment in special memory function associated with hippocampal damage (Morris et al., 1982), we investigated the long-term damage specific to this region. In the MCAo model used in this study, the cerebral cortex was mostly spared and the striatum was infarcted. Here we observed a correlation between hippocampal neurons loss and the time spent in the target zone in the control groups (regular diet and vehicle treated animals) suggesting that spatial cognitive impairment in the MWM task could be correlated with the degree of damage of the hippocampus. How MCAo induces brain lesions in the hippocampus (this work) or thalamus and hypothalamus (Hata et al., 1998), areas that are not directly supplied by the MCA, remains unclear. Recently, Castel's group proposed that damage in these deep regions might be due to the alteration of tissue perfusion by deep and small cerebral arteries arising directly from the internal carotid artery, at the proximity of the origin of MCA during the intraluminal filament insertion (El Amki et al., 2015). Therefore, vasoactive properties of ALA (Blondeau et al., 2007) could support the anastomotic network, which supplies a part of the hippocampus and the thalamus, and may participate in preservation of such areas known to be crucial to spatial learning and memory. Both types of ALA supplementation drastically reduce ischemic hemisphere atrophy and ALA induces direct *in vitro* and *in vivo* neuroprotective effects (Blondeau et al., 2001, 2002a; Heurteaux et al., 2006; Lang-Lazdunski et al., 2003; Lauritzen et al., 2000; Nguemeni et al., 2010), likely accounting for reduced damaged projections from infarcted cortex, thalamic atrophy, or denervated basal nucleus cholinergic fibers to the cortex (Fujie et al., 1990; Kataoka et al., 1991). Similarly, ALA protection from secondary damage induced in neocortical sites within the MCA territory known to also disturb spatial learning and memory independently from hippocampal lesion (Frankland and Bontempi, 2005) could account for the improvement of spatial learning and memory. However the robust hippocampal protective effect of both types of ALA supplementation against MCAo-induced hippocampal lesion observed 3 weeks after the ischemic insult is undoubtedly a determining factor in improving the recovery of MCAo-induced deficits identified in the MWM. The growing understanding of the mechanisms that underlie recovery of the damage brain involves neural plasticity (Kleim and Jones, 2008; Murphy and Corbett, 2009). Therefore functional outcome may be improved by restorative therapies through stimulation of synaptogenesis in the ischemic brain (for review see (Chopp et al., 2009; Murphy and Corbett, 2009)). Modification of the omega-3 content of dietary regimens change the genes brain expression of genes controlling synaptic plasticity, cytoskeleton and membrane association, signal transduction, ion channel formation (Kitajka et al., 2002). We and others have respectively shown that ALA injections and ALA-diet triggered neurogenesis and synaptogenesis in the adult brain (Blondeau et al., 2009a; Venna et al., 2009). Thus a casual relationship between ALA-induced synaptogenesis and cognitive recovery may be surmised. While the precise cellular and molecular targets of ALA on stroke recovery will require further investigations before being sorted out, an evident but under-studied link between ALA–induced protection and stroke recovery, that is cerebral inflammation should be considered. Clinical and experimental evidence have implicated cerebral inflammation in several aspects of stroke: neuroinflammation may not only lead to irreversible neuronal alterations, but probably contribute to worsen outcome and recovery in stroke (Allan et al., 2005; Drake et al., 2011). In contrast, several anti-inflammatory actions of omega-3 PUFAs have been proposed, including in neonatal Hypoxic–Ischemic (H/I) brain injury (Zhang et al., 2010). Indeed, Chen's laboratory has recently shown that LC-omega-3 supplementation through an EPA/DHA-enriched diet improves long-term neurological outcomes after neonatal H/I injury. This prolonged protection was attributed to an anti-inflammatory effect on microglia leading to a robust suppression of proinflammatory mediator release (Zhang et al., 2010). Our ongoing studies will determine whether suppression of neuroinflammation and release of proinflammatory cytokines (IL1-β, IL-6, TNF-a) and chemokines (MCP-1, MIP-1-alpha, IL-8) (Conductier et al., 2010; Le Thuc et al., 2015) play a critical role in mediating the neuroprotective effect of ALA supplementation after ischemic stroke.

With respect to efficiency of the oral and intravenous approach, the overall benefits of the subchronic treatment we used were less impressive than those observed with the ALA-diet. Originally, this subchronic treatment was only designed for promoting a better survival against 60 min MCAo (Blondeau et al., 2009c; Heurteaux et al., 2006). Therefore, such beneficial effects on long-term hippocampal and cognitive deficits were unanticipated and since we can not exclude that an optimization of subchronic treatment with a daily delivery may offer results of similar amplitudes as the diet enriched in ALA, it reinforces the idea that studies testing different protocols and approaches are still needed in the field.

5. Conclusions

In summary, in one of a minor number of studies concerning nutritional intervention in the critically post-stroke recovery period, we propose that nutritional intervention with ALA would help counteract stroke-induced deficits including impairments of cognition that occur in patients (Stephens et al., 2004) This case for nutritional support in ALA is also reinforced by the demonstration of an association between hippocampus and memory in humans (Burgess et al., 2002) and the correlation observed by MRI between cognitive impairments to hippocampal alteration (Lin et al., 2014) While insights into the precise mechanisms requires further studies, we identify that hippocampal preservation has an intrinsic effect of ALA treatment leading to reduced cognitive deficits, which is not due to bioconversion to DHA. Therefore, such work holds promise as an instigator of further randomized, controlled studies

group). #$p < 0.05$ versus respective contralateral hemisphere, and *$p < 0.05$ versus respective control. (**C**) Neuronal loss observed in the hippocampus 21 days post-MCAo in the regular-diet and vehicle treated groups was significantly reduced in the animal supplemented in ALA by modification of the diet or subchronic treatment. Data are represented by mean ± SEM (n = 6 per group). *$p < 0.05$. (**D**) The better preservation of the hippocampal neurons is illustrated by representative cresyl violet staining of the CA1 and CA3 neuronal layers. Scale bar is 100 μm, applicable to all sections. (**E**) A correlation that was analyzed by Pearson's analysis between hippocampal neurons loss and the time spent in the target zone was found in the control groups (regular diet and vehicle treated animals), confirming why the ALA-supplemented animal presenting less hippocampal damage had a better spatial memory recovery. The consumption of ALA-diet and the subchronic treatment did not modify in the cortex, the concentration of DHA, the major omega-3 PUFA of the brain (**F**), the pre-MCAo omega-6/omega-3 ratio (**G**), and of saturated fatty acids (SFAs), mono unsaturated fatty acids (MUFAs) and PUFAs (**H**). Data are represented by mean ± SEM (n = 5 per group).

that will be required to confirm the value of ALA in adjunctive therapy for one of medicine's most urgent priorities.

Funding sources

This work was supported by the CNRS, the Fondation pour la Recherche Médicale DRM20101220421, ONIDOL (n°889P00-01) and St Hubert grants (n°087696) and the SFNEP Bernard Beaufrère Prize.

Disclosures

None.

Acknowledgments

We thank Dr C. Rovere, O. Le Thuc, C. Widmann, N. Simon-Rousseau, C. Simonneau, A. Renault for many helpful discussions and Dr J. Tauskela for his critical reading of the manuscript. We are very grateful to Pr M. Guichardant and P. Daira (lipidomics IbiSA platform of the LISA Carnot institute), and Drs N. Combe, L. Fonseca, B. Buaud and C. Vaysse (Iterg, Equipe Nutrition, Métabolisme et Santé) for Fatty Acid Analysis.

References

Allan, S.M., Tyrrell, P.J., Rothwell, N.J., 2005. Interleukin-1 and neuronal injury. Nat. Rev. Immunol. 5, 629–640.
Aquilani, R., Scocchi, M., Iadarola, P., Viglio, S., Pasini, E., Condello, S., Boschi, F., Pastoris, O., Bongiorno, A.I., Verri, M., 2010. Spontaneous neurocognitive retrieval of patients with sub-acute ischemic stroke is associated with dietary protein intake. Nutr. Neurosci. 13, 129–134.
Awada, M., Meynier, A., Soulage, C.O., Hadji, L., Geloen, A., Viau, M., Ribourg, L., Benoit, B., Debard, C., Guichardant, M., Lagarde, M., Genot, C., Michalski, M.C., 2013. n-3 PUFA added to high-fat diets affect differently adiposity and inflammation when carried by phospholipids or triacylglycerols in mice. Nutr. Metab. (Lond) 10, 23.
Balkaya, M., Krober, J.M., Rex, A., Endres, M., 2013. Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. J. Cereb. Blood Flow. Metab. 33, 330–338.
Belayev, L., Khoutorova, L., Atkins, K.D., Eady, T.N., Hong, S., Lu, Y., Obenaus, A., Bazan, N.G., 2011. Docosahexaenoic acid therapy of experimental ischemic stroke. Transl. Stroke Res. 2, 33–41.
Blondeau, N., 2016 Jan. The nutraceutical potential of omega-3 alpha-linolenic acid in reducing the consequences of stroke. Biochimie 120, 49–55. http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.06.005.
Blondeau, N., Debruyne, D., Piens, M., Nguemeni, C., Plumier, J.C., Lipsky, R.H., Marini, A.M., Heurteaux, C., 2009a. Brain plasticity and anti-depressant effects are versatile potential of alpha-linolenic acid to promote stroke recovery. J. Cereb. Blood Flow Metabolism 29, S545.
Blondeau, N., Lauritzen, I., Widmann, C., Lazdunski, M., Heurteaux, C., 2002a. A potent protective role of lysophospholipids against global cerebral ischemia and glutamate excitotoxicity in neuronal cultures. J. Cereb. Blood Flow. Metab. 22, 821–834.
Blondeau, N., Lipsky, R.H., Bourourou, M., Duncan, M.W., Gorelick, P.B., Marini, A.M., 2015. Alpha-linolenic acid: an omega-3 fatty acid with neuroprotective properties-ready for use in the stroke clinic? Biomed. Res. Int. 2015, 519830.
Blondeau, N., Nguemeni, C., Debruyne, D.N., Piens, M., Wu, X., Pan, H., Hu, X., Gandin, C., Lipsky, R.H., Plumier, J.C., Marini, A.M., Heurteaux, C., 2009b. Sub-chronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke. Neuropsychopharmacology 34, 2548–2559.
Blondeau, N., Nguemeni, C., Debruyne, D.N., Piens, M., Wu, X., Pan, H., Hu, X., Gandin, C., Lipsky, R.H., Plumier, J.C., Marini, A.M., Heurteaux, C., 2009c. Sub-chronic alpha-linolenic acid treatment enhances brain plasticity and exerts an antidepressant effect: a versatile potential therapy for stroke. Neuropsychopharmacology 34, 2548–2559.
Blondeau, N., Petrault, O., Manta, S., Giordanengo, V., Gounon, P., Bordet, R., Lazdunski, M., Heurteaux, C., 2007. Polyunsaturated fatty acids are cerebral vasodilators via the TREK-1 potassium channel. Circ. Res. 101, 176–184.
Blondeau, N., Tauskela, J.S., 2013. A new future in brain preconditioning based on nutraceuticals: a focus on a-linolenic omega-3 fatty acid for stroke protection. In: Gidday, J.M., Perez-Pinzon, M.A., Zhang, J.H. (Eds.), Innate Tolerance in the CNS. Springer New York, New York, pp. 133–163.
Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M., Heurteaux, C., 2001. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. J. Neurosci. 21, 4668–4677.
Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M., Heurteaux, C., 2002b. Polyunsaturated fatty acids induce ischemic and epileptic tolerance. Neuroscience 109, 231–241.
Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M., Heurteaux, C., 2003. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. In: Krieglstein, J., Klumpp, S. (Eds.), Pharmacology of Cerebral Ischemia. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart.
Bourre, J.M., Dumont, O., Pascal, G., Durand, G., 1993. Dietary alpha-linolenic acid at 1.3 g/kg maintains maximal docosahexaenoic acid concentration in brain, heart and liver of adult rats. J. Nutr. 123, 1313–1319.
Burgess, N., Maguire, E.A., O'Keefe, J., 2002. The human hippocampus and spatial and episodic memory. Neuron 35, 625–641.
Calautti, C., Baron, J.C., 2003. Functional neuroimaging studies of motor recovery after stroke in adults: a review. Stroke 34, 1553–1566.
Chopp, M., Li, Y., Zhang, Z.G., 2009. Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies. Stroke 40, S143–S145.
Collaboration, F.T., 2003. Poor nutritional status on admission predicts poor outcomes after stroke: observational data from the FOOD trial. Stroke 34, 1450–1456.
Conductier, G., Blondeau, N., Guyon, A., Nahon, J.L., Rovere, C., 2010. The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. J. Neuroimmunol. 224, 93–100.
Contreras, A.V., Torres, N., Tovar, A.R., 2013. PPAR-alpha as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. Adv. Nutr. 4, 439–452.
Cramer, S.C., 2008. Repairing the human brain after stroke. II. Restorative therapies. Ann. Neurol. 63, 549–560.
Cumming, T.B., Marshall, R.S., Lazar, R.M., 2013. Stroke, cognitive deficits, and rehabilitation: still an incomplete picture. Int. J. Stroke 8, 38–45.
Dennis, M.S., Lewis, S.C., Warlow, C., Collaboration, F.T., 2005. Routine oral nutritional supplementation for stroke patients in hospital (FOOD): a multicentre randomised controlled trial. Lancet 365, 755–763.
Di Pino, G., Pellegrino, G., Assenza, G., Capone, F., Ferreri, F., Formica, D., Ranieri, F., Tombini, M., Ziemann, U., Rothwell, J.C., Di Lazzaro, V., 2014. Modulation of brain plasticity in stroke: a novel model for neurorehabilitation. Nat. Rev. Neurol. 10, 597–608.
Dittmar, M., Spruss, T., Schuierer, G., Horn, M., 2003. External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke 34, 2252–2257.
Drake, C., Boutin, H., Jones, M.S., Denes, A., McColl, B.W., Selvarajah, J.R., Hulme, S., Georgiou, R.F., Hinz, R., Gerhard, A., Vail, A., Prenant, C., Julyan, P., Maroy, R., Brown, G., Smigova, A., Herholz, K., Kassiou, M., Crossman, D., Francis, S., Proctor, S.D., Russell, J.C., Hopkins, S.J., Tyrrell, P.J., Rothwell, N.J., Allan, S.M., 2011. Brain inflammation is induced by co-morbidities and risk factors for stroke. Brain Behav. Immun. 25, 1113–1122.
El Amki, M., Clavier, T., Perzo, N., Bernard, R., Guichet, P.O., Castel, H., 2015. Hypothalamic, thalamic and hippocampal lesions in the mouse MCAO model: potential involvement of deep cerebral arteries? J. Neurosci. Methods 254, 80–85.
Evarts, E.V., Wise, S.P., 1984. Basal ganglia outputs and motor control. Ciba Found. Symp. 107, 83–102.
Forman, B.M., Chen, J., Evans, R.M., 1997. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 4312–4317.
Frankland, P.W., Bontempi, B., 2005. The organization of recent and remote memories. Nat. Rev. Neurosci. 6, 119–130.
Freret, T., Schumann-Bard, P., Boulouard, M., Bouet, V., 2011. On the importance of long-term functional assessment after stroke to improve translation from bench to bedside. Exp. Transl. Stroke Med. 3, 6.
Fujie, W., Kirino, T., Tomukai, N., Iwasawa, T., Tamura, A., 1990. Progressive shrinkage of the thalamus following middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke 21, 1485–1488.
Gariballa, S.E., Parker, S.G., Taub, N., Castleden, C.M., 1998. Influence of nutritional status on clinical outcome after acute stroke. Am. J. Clin. Nutr. 68, 275–281.
Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Blaha, M.J., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., Franco, S., Fullerton, H.J., Gillespie, C., Hailpern, S.M., Heit, J.A., Howard, V.J., Huffman, M.D., Judd, S.E., Kissela, B.M., Kittner, S.J., Lackland, D.T., Lichtman, J.H., Lisabeth, L.D., Mackey, R.H., Magid, D.J., Marcus, G.M., Marelli, A., Matchar, D.B., McGuire, D.K., Mohler 3rd, E.R., Moy, C.S., Mussolino, M.E., Neumar, R.W., Nichol, G., Pandey, D.K., Paynter, N.P., Reeves, M.J., Sorlie, P.D., Stein, J., Towfighi, A., Turan, T.N., Virani, S.S., Wong, N.D., Woo, D., Turner, M.B., 2014. Executive summary: heart disease and stroke statistics–2014 update: a report from the American Heart Association. Circulation 129, 399–410.
Golanov, E.V., Reis, D.J., 1995. Contribution of cerebral edema to the neuronal salvage elicited by stimulation of cerebellar fastigial nucleus after occlusion of the middle cerebral artery in rat. J. Cereb. Blood Flow. Metab. 15, 172–174.
Gouix, E., Buisson, A., Nieoullon, A., Kerkerian-Le Goff, L., Tauskela, J.S., Blondeau, N., Had-Aissouni, L., 2014. Oxygen glucose deprivation-induced astrocyte dysfunction provokes neuronal death through oxidative stress. Pharmacol. Res. 87, 8–17.
Gustavsson, A., Svensson, M., Jacobi, F., Allgulander, C., Alonso, J., Beghi, E., Dodel, R., Ekman, M., Faravelli, C., Fratiglioni, L., Gannon, B., Jones, D.H., Jennum, P., Jordanova, A., Jonsson, L., Karampampa, K., Knapp, M., Kobelt, G., Kurth, T., Lieb, R., Linde, M., Ljungcrantz, C., Maercker, A., Melin, B., Moscarelli, M., Musayev, A., Norwood, F., Preisig, M., Pugliatti, M., Rehm, J., Salvador-Carulla, L., Schlehofer, B., Simon, R., Steinhausen, H.C., Stovner, L.J., Vallat, J.M., Van den Bergh, P., van Os, J., Vos, P., Xu, W., Wittchen, H.U., Jonsson, B., Olesen, J.,

Group, C.D., 2011. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. Eur. Neuropsychopharmacol. 21, 718–779.
Hankey, G.J., 2012. Nutrition and the risk of stroke. Lancet Neurol. 11, 66–81.
Hata, R., Mies, G., Wiessner, C., Fritze, K., Hesselbarth, D., Brinker, G., Hossmann, K.A., 1998. A reproducible model of middle cerebral artery occlusion in mice: hemodynamic, biochemical, and magnetic resonance imaging. J. Cereb. Blood Flow. Metab. 18, 367–375.
Heller, A.R., Fischer, S., Rossel, T., Geiger, S., Siegert, G., Ragaller, M., Zimmermann, T., Koch, T., 2002. Impact of n-3 fatty acid supplemented parenteral nutrition on haemostasis patterns after major abdominal surgery. Br. J. Nutr. 87 (Suppl. 1), S95–S101.
Heller, A.R., Rossler, S., Litz, R.J., Stehr, S.N., Heller, S.C., Koch, R., Koch, T., 2006. Omega-3 fatty acids improve the diagnosis-related clinical outcome. Crit. Care Med. 34, 972–979.
Heurteaux, C., Laigle, C., Blondeau, N., Jarretou, G., Lazdunski, M., 2006. Alpha-linolenic acid and riluzole treatment confer cerebral protection and improve survival after focal brain ischemia. Neuroscience 137, 241–251.
Ji, S., Kronenberg, G., Balkaya, M., Farber, K., Gertz, K., Kettenmann, H., Endres, M., 2009. Acute neuroprotection by pioglitazone after mild brain ischemia without effect on long-term outcome. Exp. Neurol. 216, 321–328.
Johansson, B.B., 2011. Current trends in stroke rehabilitation. A review with focus on brain plasticity. Acta Neurol. Scand. 123, 147–159.
Johnston, S.C., Mendis, S., Mathers, C.D., 2009. Global variation in stroke burden and mortality: estimates from monitoring, surveillance, and modelling. Lancet Neurol. 8, 345–354.
Jonsson, A.C., Lindgren, I., Norrving, B., Lindgren, A., 2008. Weight loss after stroke: a population-based study from the Lund Stroke Register. Stroke 39, 918–923.
Jorgensen, H.S., Nakayama, H., Raaschou, H.O., Olsen, T.S., 1995. Recovery of walking function in stroke patients: the Copenhagen Stroke Study. Arch. Phys. Med. Rehabil. 76, 27–32.
Kataoka, K., Hayakawa, T., Kuroda, R., Yuguchi, T., Yamada, K., 1991. Cholinergic deafferentation after focal cerebral infarct in rats. Stroke 22, 1291–1296.
Katchanov, J., Harms, C., Gertz, K., Hauck, L., Waeber, C., Hirt, L., Priller, J., von Harsdorf, R., Bruck, W., Hortnagl, H., Dirnagl, U., Bhide, P.G., Endres, M., 2001. Mild cerebral ischemia induces loss of cyclin-dependent kinase inhibitors and activation of cell cycle machinery before delayed neuronal cell death. J. Neurosci. 21, 5045–5053.
Katchanov, J., Waeber, C., Gertz, K., Gietz, A., Winter, B., Bruck, W., Dirnagl, U., Veh, R.W., Endres, M., 2003. Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. Brain Pathol. 13, 452–464.
Kilic, E., ElAli, A., Kilic, U., Guo, Z., Ugur, M., Uslu, U., Bassetti, C. L., Schwab, M. E., Hermann, D. M., Role of Nogo-A in neuronal survival in the reperfused ischemic brain. J. Cereb. Blood Flow. Metab. 30, 969–984.
Kitajka, K., Puskas, L.G., Zvara, A., Hackler Jr., L., Barcelo-Coblijn, G., Yeo, Y.K., Farkas, T., 2002. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 2619–2624.
Kleim, J.A., Jones, T.A., 2008. Principles of experience-dependent neural plasticity: implications for rehabilitation after brain damage. J. Speech Lang. Hear Res. 51, S225–S239.
Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J., 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. Circulation 106, 2747–2757.
Lang-Lazdunski, L., Blondeau, N., Jarretou, G., Lazdunski, M., Heurteaux, C., 2003. Linolenic acid prevents neuronal cell death and paraplegia after transient spinal cord ischemia in rats. J. Vasc. Surg. 38, 564–575.
Langhorne, P., Bernhardt, J., Kwakkel, G., 2011. Stroke rehabilitation. Lancet 377, 1693–1702.
Langhorne, P., Coupar, F., Pollock, A., 2009. Motor recovery after stroke: a systematic review. Lancet Neurol. 8, 741–754.
Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G., Lazdunski, M., 2000. Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. Embo J. 19, 1784–1793.
Le Thuc, O., Blondeau, N., Nahon, J.L., Rovère, C., 2015 Sep. The complex contribution of chemokines to neuroinflammation: switching from beneficial to detrimental effects. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1351, 127–140. http://dx.doi.org/10.1111/nyas.12855.
Lee, J.H., Zheng, Y., von Bornstadt, D., Wei, Y., Balcioglu, A., Daneshmand, A., Yalcin, N., Yu, E., Herisson, F., Atalay, Y.B., Kim, M.H., Ahn, Y.J., Balkaya, M., Sweetnam, P., Schueller, O., Poyurovsky, M.V., Kim, H.H., Lo, E.H., Furie, K.L., Ayata, C., 2014. Selective ROCK2 inhibition in focal cerebral ischemia. Ann. Clin. Transl. Neurol. 1, 2–14.
Lin, Z.C., Tao, J., Gao, Y.L., Yin, D.Z., Chen, A.Z., Chen, L.D., 2014. Analysis of central mechanism of cognitive training on cognitive impairment after stroke: resting-state functional magnetic resonance imaging study. J. Int. Med. Res. 42, 659–668.
Lincoln, N.B., Majid, M.J., Weyman, N., 2000. Cognitive rehabilitation for attention deficits following stroke. Cochrane Database Syst. Rev. 4. CD002842.
Lloyd-Jones, D., Adams, R.J., Brown, T.M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T.B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P.M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., Lisabeth, L., Marelli, A., McDermott, M.M., Meigs, J., Mozaffarian, D., Mussolino, M., Nichol, G., Roger, V.L., Rosamond, W., Sacco, R., Sorlie, P., Thom, T., Wasserthiel-Smoller, S., Wong, N.D., Wylie-Rosett, J., 2010. Heart disease and stroke statistics–2010 update: a report from the American Heart Association. Circulation 121, e46–e215.
Matsuura, K., Kabuto, H., Makino, H., Ogawa, N., 1997. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. J. Neurosci. Methods 73, 45–48.
Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe, J., 1982. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature 297, 681–683.
Murphy, T.H., Corbett, D., 2009. Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. Nat. Rev. Neurosci. 10, 861–872.
Nair, R.D., Lincoln, N.B., 2007 Jul 18. Cognitive rehabilitation for memory deficits following stroke. Cochrane Database Syst. Rev. 3. CD002293.
Nguemeni, C., Delplanque, B., Rovere, C., Simon-Rousseau, N., Gandin, C., Agnani, G., Nahon, J.L., Heurteaux, C., Blondeau, N., 2010. Dietary supplementation of alpha-linolenic acid in an enriched rapeseed oil diet protects from stroke. Pharmacol. Res. 61, 226–233.
Nguemeni, C., Gouix, E., Bourourou, M., Heurteaux, C., Blondeau, N., 2013. Alpha-linolenic acid: a promising nutraceutical for the prevention of stroke. PharmaNutrition 1, 1–8.
Pilz, S., Tomaschitz, A., Drechsler, C., Zittermann, A., Dekker, J.M., Marz, W., 2011. Vitamin D supplementation: a promising approach for the prevention and treatment of strokes. Curr. Drug Targets 12, 88–96.
Plamondon, H., Roberge, M.C., 2008. Dietary PUFA supplements reduce memory deficits but not CA1 ischemic injury in rats. Physiol. Behav. 95, 492–500.
Pudelkewicz, C., Seufert, J., Holman, R.T., 1968. Requirements of the female rat for linoleic and linolenic acids. J. Nutr. 94, 138–146.
Quintard, H., Borsotto, M., Veyssiere, J., Gandin, C., Labbal, F., Widmann, C., Lazdunski, M., Heurteaux, C., 2011. MLC901, a traditional Chinese medicine protects the brain against global ischemia. Neuropharmacology 61, 622–631.
Rehni, A.K., Singh, T.G., 2012. Involvement of CCR-2 chemokine receptor activation in ischemic preconditioning and postconditioning of brain in mice. Cytokine 60, 83–89.
Riediger, N.D., Othman, R.A., Suh, M., Moghadasian, M.H., 2009. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. J. Am. Diet. Assoc. 109, 668–679.
Rogers, D.C., Campbell, C.A., Stretton, J.L., Mackay, K.B., 1997. Correlation between motor impairment and infarct volume after permanent and transient middle cerebral artery occlusion in the rat. Stroke 28, 2060–2065 discussion 2066.
Scherbakov, N., Dirnagl, U., Doehner, W., 2011. Body weight after stroke: lessons from the obesity paradox. Stroke 42, 3646–3650.
Stephens, S., Kenny, R.A., Rowan, E., Allan, L., Kalaria, R.N., Bradbury, M., Ballard, C.G., 2004. Neuropsychological characteristics of mild vascular cognitive impairment and dementia after stroke. Int. J. Geriatr. Psychiatry 19, 1053–1057.
Strong, K., Mathers, C., Bonita, R., 2007. Preventing stroke: saving lives around the world. Lancet Neurol. 6, 182–187.
Venna, V.R., Deplanque, D., Allet, C., Belarbi, K., Hamdane, M., Bordet, R., 2009. PUFA induce antidepressant-like effects in parallel to structural and molecular changes in the hippocampus. Psychoneuroendocrinology 34, 199–211.
Ward, P., Seri, Cavanna, A. E., Functional neuroanatomy and behavioural correlates of the basal ganglia: evidence from lesion studies. Behav. Neurol. 26, 219–223.
Winter, B., Bert, B., Fink, H., Dirnagl, U., Endres, M., 2004. Dysexecutive syndrome after mild cerebral ischemia? Mice learn normally but have deficits in strategy switching. Stroke 35, 191–195.
Zhang, W., Hu, X., Yang, W., Gao, Y., Chen, J., 2010. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation confers long-term neuroprotection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury through anti-inflammatory actions. Stroke 41, 2341–2347.

Central CCL2 signaling onto MCH neurons mediates metabolic and behavioral adaptation to inflammation

Ophélia Le Thuc[1,2], Céline Cansell[1,2], Miled Bourourou[1,2], Raphaël G.P. Denis[3], Nadège Devaux[1,2], Alice Guyon[1,2], Julie Cazareth[1,2], Catherine Heurteaux[1,2], William Rostène[4], Serge Luquet[3], Nicolas Blondeau[1,2#], Jean-Louis Nahon[1,2,5*,#] and Carole Rovère[1,2,*,#]

[1] Université de Nice Sophia Antipolis, Sophia Antipolis, F-06560, France;

[2] CNRS, IPMC, Sophia Antipolis, F-06560, France;

[3] Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative, CNRS UMR 8251, F-75205 Paris, France

[4] Institut de la Vision, UMRS 968-Université Pierre et Marie Curie, F-75012 Paris, France.

[5] Station de Primatologie, UPS846 CNRS, F-13790 Rousset-sur-Arc, France.

Authorship note

#These co-authors share last author position.

*Correspondence to Dr Carole Rovère (rovere@ipmc.cnrs.fr) and Dr Jean-Louis Nahon (nahonjl@ipmc.cnrs.fr)

Running title

LPS-induced weight loss is mediated through CCL2

Abstract

Sickness behavior defines the endocrine, autonomic, behavioral and metabolic responses associated with infection. While inflammatory responses were suggested to be instrumental in the loss of appetite and body weight, the molecular underpinning remains unknown. Here we show that systemic or central lipopolysaccharide (LPS) injection results in specific hypothalamic changes characterized by a precocious increase in the chemokine ligand 2 (CCL2) followed by an increase in pro-inflammatory cytokines and decrease in the orexigenic neuropeptide melanin-concentrating hormone (MCH). We therefore hypothesized that CCL2 could be the central relay for the loss in body weight induced by the inflammatory signal LPS. We found that central CCL2 delivery promotes neuroinflammation and the decrease of MCH and body weight. MCH neurons were found to express CCL2 receptor and to respond to CCL2 by decreasing both electrical activity and MCH release. Pharmacological or genetic inhibition of CCL2 signaling could oppose the response to LPS at both molecular and physiologic levels. We concluded that CCL2 signaling onto MCH neurons represents a core mechanism that relay peripheral inflammation to sickness behavior.

Keywords: Weight loss / neuroinflammation / CCL2 chemokine / CCR2 signaling pathway / Melanin Concentrating Hormone

Introduction

Sickness behavior refers to the broad metabolic and behavioral changes that develop over the course of illness in response to inflammatory stimuli. Among these pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α), as well as chemokines, can directly alters mood, food intake and body weight through local action onto central hypothalamic network regulation energy balance and stress response [1-4].

In visceral injuries, local production of cytokines can rapidly signal to the brain via a direct action onto primary afferent nerves, including the vagus and the trigeminal nerves. Following bacterial infection, activation of resident macrophages of the choroid plexus and of the circumventricular organs, devoid of blood-brain-barrier (BBB), induce synthesis of pro-inflammatory cytokines that directly enter the brain. Peripheral cytokines may also cross the BBB using saturable transport systems or transitory local openings. Cytokine activation of perivascular macrophages and brain endothelial cells generate prostaglandins E2 that act on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to regulate stress responses [5]. Finally, the central nervous system (CNS) may synthesize *de novo* cytokines following systemic or central inflammation [6]. However, the cellular and molecular basis by which peripheral inflammation is integrated centrally to adapt food intake and body weight remains largely unknown.

Lipopolysaccharide (LPS), when injected peripherally, triggers all the key features of sickness behavior i.e. peripheral and central inflammation, suppression of appetite and weight loss [7]. While the molecular underpinnings remain unknown, it has been shown that central, rather than peripheral inflammation, is mediating LPS-induced appetite and weight loss [8] and interestingly, CNS inflammation can be triggered independently from systemic cytokines, by non-hematopoietic cells of the brain expressing the LPS receptor: the Toll like receptor 4 (TLR4) [9]. Central neural substrate regulating feeding and energy expenditure is composed of several neuropeptidergic circuits primarily located in the hypothalamus and brainstem. Among these, the "first order" neuronal populations that lie close to circumventricular organs integrate circulating signals of hunger and satiety and represent also a target for peripheral inflammatory signals. They include both orexigenic/anabolic producing neuropeptide Y (NPY)/agouti-related polypeptide (AgRP) and anorectic/catabolic neurons that produce pro-opiomelanocortin (POMC)/cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) in the

arcuate nucleus (ARC). Once ARC neurons have integrated peripheral signals, they, in turn, project to "second order" neurons located in various brain regions, including hypothalamic areas such as the lateral hypothalamic area (LHA), the ventromedial hypothalamic area (VMH) and the paraventricular nucleus (PVN) [10] [11]. The hypothalamus-brainstem structure is referred as to the homeostatic circuitry and operates adaptive metabolic and behavioral responses that regulate body weight. [12].

Thus, it was tempting to speculate that central inflammatory signaling may temporarily alter "first order" and "second order" neurons to promote LPS-provoked weight loss. While few interleukins receptors were found on hypothalamic neurons [13, 14], they are particularly lacking in the LHA neurons whereas chemokine receptors are widely expressed and functional onto hypothalamic neurons [15], particularly the orexigenic melanin-concentrating hormone (MCH) [16-20] and the hypocretins/orexins (ORX) neurons [21].

We thus hypothesized that chemokines could be crucial intermediates connecting peripheral inflammation to the neuronal substrate mediating metabolic changes and anorexia associated with sickness behavior.

Among chemokines, we identified the monocyte chemoattractant protein 1 MCP-1/ C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2) as a potential key player because CCL2 is expressed in glial cells and discrete neuronal populations [22], is consistently increased in the CNS following peripheral inflammation [23] and has been shown to be crucially involved in LPS-mediated brain inflammation [24]. Using genetic, electrophysiological and pharmacological approaches, we demonstrate that CCL2/CCR2 signaling onto MCH neurons is the core mechanism by which peripheral inflammatory response is centrally relayed to operate the behavioral and metabolic changes associated with sickness behavior.

Results

Systemic injection of LPS induces neuroinflammation and activates gene expression of neuropeptides involved in feeding behavior/energy balance

In order to fully characterize the sequence of molecular events that occurs at the central level in response to peripheral inflammation, we first studied the dose-response relationship of peripheral LPS injection on sickness behavior response. Intraperitoneal (ip) injection of 5µg of LPS per mouse recapitulated most of the characteristic response seen in

sickness behavior and was therefore selected for subsequent molecular analyses (Fig EV1A). We next performed a time-course study using targeted transcription profiling by PCR analysis study of pro-inflammatory cytokine genes (IL-1β, IL-6, TNF-α) and selected neuropeptides-encoding genes involved in feeding behavior to precise the molecular events that occur at hypothalamic level after ip LPS injection. As expected [25], ip LPS injection induced a very early (1-3 after post-injection) overexpression of the pro-inflammatory cytokine mRNAs (IL-1β, IL-6, TNF-α), with specific profiles (Fig EV1B). LPS ip challenge also induced, 1 hour after injection, a transitory, yet massive (up to 20-fold), induction of all the energy-related neuropeptides mRNA-encoding genes expressed in the ARC (POMC, CART, NPY, AgRP) (Fig EV1D). Strikingly, ip LPS injection induced a delayed and sustained decrease of MCH and ORX mRNA expression 24h and 48h after injection (Fig EV1E).

Central inflammation mediated by LPS activates the expression of pro-inflammatory cytokines and CCL2 chemokine family

A dose of 500ng LPS/mouse injected centrally was selected based on its ability to recapitulate the time course of weight loss observed after peripheral injection (Fig 1A). Hypothalamic mRNA coding for cytokines and chemokines were quantified in a time window that precedes the first wave of increased cytokine gene expression and before down-regulation of MCH or ORX gene expression i.e. 6h after LPS or saline icv injection. LPS induced a 4- to 8-fold increase in mRNA encoding IL-1β, IL17A and several other pro-inflammatory cytokines, including TNFα (Fig 1B). Strikingly, the most robust activation of expression was found for genes encoding the CCL chemokines that bind to the CCR2 and/or CCR5 receptors (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL7; (Fig 1C)). As CCL2 plays a major role in brain inflammation following peripheral injection of LPS and selectively interacts with CCR2 in rodent brains [24, 26, 27], we focused on the CCL2/CCR2 signaling as a potential key mechanism relaying centrally the action of peripheral inflammation.

Central CCR2 signaling is required to operate metabolic and behavioral changes induced by LPS

Brain injection of 500 ng LPS in WT mice induced a long-lasting decrease in body weight compare to saline-injected WT mice (Fig 2A and S1). Pharmacologic or genetic blockade of CCL2/CCR2 signaling were achieved through either central CCR2 antagonist injection or in the genetic context of CCR2 KO mice. CCR2 antagonist injected mice and

genetic impairment of CCR2 signaling prevented LPS-induced weight loss with a maximum effect at the early times (6-8 hours) and a late partial recovery (Fig 2A-C).

Integrated analysis of energy homeostasis using indirect calorimetry coupled with activity and feeding measurement was used to fully characterize the physiologic implication of CCL2/CCR2 signaling in LPS-induced metabolic changes. Body weight loss following central LPS delivery was associated with a sharp decrease in food intake, energy expenditure, locomotor activity and a metabolic shift towards lipid oxidation profile as indicated by both fat oxidation and respiratory quotient analysis (Fig 2 and EV2). Pharmacologically opposing CCR2 signaling through central delivery of the selective CCR2 antagonist INCB344 [28] affected various aspect of LPS-induced weight loss. First CCR2 antagonist counteracted the anorectic response initiated by LPS (Fig 2D, E), and mitigated the acute decrease in energy expenditure (Fig EV2C, D). Peripheral substrate utilization were calculated based on respiratory exchange ratio (VCO2/VO2: RER=1 indicative of carbohydrate oxidation and RER=0.7 indicative of lipid oxidation) and revealed while icv LPS injection induced a sharp shift in lipid oxidation profile Fig 2F, (G and Fig EV2E, F), CCR2 signaling blockade protected fat stores while opposing this shift (Fig 2F, G and Fig EV2E, F). Importantly, the action of both LPS and CCR2 signaling could only be partially correlated to change in food intake and locomotor activity (Fig 2D, E and EV2A, B). Those results indicate that central inflammation not only affects feeding but also peripheral nutrient partitioning in a CCR2 dependent manner.

Brain-injected LPS reduces MCH mRNA and peptide expression through CCR2 signaling

To study the molecular mechanisms involved in inflammation-induced weight loss and associated changes in energy balance at the brain level, and particularly at the hypothalamic level, we determined levels of mRNA encoding cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α), 1, 3, 6, 18 and 24h after intracerebroventricular (icv) injection of LPS, to cover primary responses, and 18 and 24h after injection, to analyze secondary and counteractive responses. As shown in Fig 3A, IL-1β mRNA expression levels displayed two distinct waves that peaked at 3h and 18h (23-fold) post-injection while IL-6 mRNA (16-fold) and TNF-α mRNA (7-fold) levels were transitorily elevated at 3h in the LPS-treated group as compared to the saline controls. We also determined the temporal patterns of CCL2 expression induced by icv injection of LPS and confirmed the strong up-regulation of both gene and protein, 3 and 6h after LPS icv (Fig 3B and C) and ip (Fig EV1C) injection, respectively.

For the neuropeptides-encoding mRNAs, there are differentiable responses following LPS icv injection. Robust (up to 12 fold) and transitory peak of induction was found for POMC (but not CART) (Fig EV3 A and B) whereas NPY (and also AgRP) mRNA expression was down-regulated (2-fold) at 1h post-injection (Fig EV3 C and D). In contrast, a late and sustained down-regulation occurred for MCH mRNA (Fig 3D) and ORX (Fig EV4 A) 18h and 24h after LPS injection. We therefore characterized the protein levels of MCH and ORX and found that they followed the mRNA patterns observed at 1, 6, 18h LPS post-injection. MCH (53.5±5.2 ng/mg of proteins) (Fig 3E) and ORX (83.1±2.1 ng/mg of proteins) (Fig EV4B) dropped down compared to saline group at 18h post-LPS. No change was observed for both neuropeptides in the cerebellum extracts used as negative controls (Fig 3E and EV4B).

Finally, we examined the relative importance of the CCR2 signaling pathway in the MCH-expressing neuronal network. Strikingly, the 2-fold decrease in MCH mRNA expression at 18h LPS post-injection was reversed in mice treated with the selective CCR2 antagonist INCB3344 [28] and in CCR2 KO mice (at 81% and 77% of the initial MCH mRNA content, respectively) (Fig 3F), suggesting that CCR2 signaling could play a fundamental role in the LPS-based neuroinflammatory response leading to MCH gene down-regulation.

Brain-injected CCL2 suppresses MCH mRNA and peptide expression through CCR2 signaling

We tested thereafter the hypothesis that a specific activation of CCR2 signaling may mimic the spectrum of cytokine/chemokine and neuropeptide gene expression variations observed following LPS treatment. We found that CCL2 icv injection increased mRNA coding for IL-1β, IL-6 and TNF-α by a 5.5-, 2.3- and 2.8-fold respectively at 6h post-injection (Fig 4A). A fast (1h) and long-lasting (up to 18h) activation of both CCL2 mRNA and protein levels was also found in the hypothalamus (Fig 4B and C). Finally, expression of MCH or ORX-encoding mRNA was down-regulated by 2.1 and 2.6-fold at 6 and 18h, respectively (Fig 4D and EV4C). At the protein levels, CCL2 injection significantly decreased by 2-fold both MCH and ORX peptides concentrations compared to control group at 6 and 18h post-injection (Fig 4E and EV4D). No change was observed for both neuropeptides in the cerebellum extracts used as negative controls (Fig 4E and EV4D).

Finally the 2-fold decrease in MCH mRNA expression at 18h LPS post-injection was blunted in CCR2 KO mice and in mice treated with INCB3344 (Fig 4F). This demonstrated

that CCL2-induced MCH down-regulation in the LHA was fully dependent upon the CCR2 signaling pathway.

CCR2 is expressed by MCH but not ORX neurons in the LHA of normal mice

As the distribution of CCR2 in normal rodent brain was poorly described [23], we characterized CCR2-immunoreactivity (CCR2-IR) in mice expressing cyan fluorescent protein (CFP) under the control of the MCH promoter (MCH-CFP) [29, 30]. MCH (green) and CCR2 (red) immunoreactivities largely overlapped demonstrating that most of the MCH neurons expressed CCR2 receptors (approximately 70 %; Fig 5A) whereas CCR2-immunoreactivity was not found within ORX-expressing cells (Fig EV4E).

CCL2 directly hyperpolarizes MCH neurons in mouse brain slices

We performed patch-clamp experiments on fluorescent neurons expressing MCH of the lateral hypothalamic slices prepared from MCH-CFP mice. CCL2 application hyperpolarized MCH neurons (Fig 5B). CCR2 antagonist INCB3344 prevented CCL2-induced hyperpolarization (Fig 5B) and the hyperpolarization amplitude was dependent on CCL2 concentration (Fig 5C). It was of (absolute value in mV) 2.17±0.94 at 0.1nM CCL2, 3.45±0.56 at 1nM CCL2 and 5.63±1.08 at 10nM CCL2.

We investigated whether the hyperpolarization induced by CCR2 activation could be due to G protein activated inward rectifier current (GIRK) activation. The effect inverted around -80 mV that is the equilibrium potential for K^+ ions. We found that 1nM CCL2 effect was significantly blocked by previous application of 200µM barium, a concentration known to inhibit specifically KIR channels (Fig 5C). 200µM barium alone induced a significant depolarization of MCH neurons (of 10.00±1.67 mV), suggesting that KIR channels are spontaneously opened under control conditions in MCH neurons. We then measured the current induced by CCL2 in voltage clamp at a holding potential of -60mV, with a KCl intracellular solution. CCL2 (10nM) induced a small outward current (+7.5±1.44pA) associated with a decrease in membrane resistance (Fig EV5 A and B). CCL2 (10nM) also increased by 30% the frequency of spontaneous post-synaptic currents without significant effect on the amplitude of these events (Fig EV5 C and D).

Finally, we investigated the consequences of the CCL2 effects on action potential (AP) discharge (Fig 5D). CCL2 induces either delays (Fig 5D, left panel) or failures (Fig 5D, right panel) in action potential emission. This effect was likely a consequence of a decrease in membrane resistance due to GIRK channels and/or receptor channels opening.

CCL2 abolishes KCl-induced MCH release from hypothalamic explants

Based on our observations of decrease in MCH neurons excitability, we evaluated whether CCL2 could modulate MCH release induced by a robust KCl-mediated neuronal depolarization. Perifusion of hypothalamic tissues with 60mM KCl for 30 min induced a 3.1-fold increase in MCH release (Fig 5E, black line). Strikingly, this increase was fully blunted by co-application of CCL2 (Fig 5E, red line), an inhibitory effect reversed by addition of the CCR2 antagonist INCB3344 (Fig 5E, blue line). In contrast to MCH secretion, application of CCL2 did not prevent ORX release (Fig EV5F).

LPS or CCL2-induced weight loss may be driven by the MCH/MCHR1 signaling

Finally, we tested whether *in vivo* MCH signaling through MCHR1 was an important element to mediate LPS or CCL2-induced weight loss (Fig. 5F). In agreement with previous studies [18, 31] the pharmacological inhibition of the MCH receptor by the specific antagonist H6408 blocked the basal orexigenic tone leading to a slight weight loss. LPS but not CCL2 injection doubled this response, suggesting a similar range of action for CCL2 or MCH antagonist on the weight loss. Similar effects were noted in presence or not of H6408 at both 6h and 24h LPS post-injection. In contrast, an additive effect of the MCH antagonist was noted on the CCL2-driven weight loss at 6h but not 24h, highly suggesting that the MCH signaling pathway could participate as a major downstream element at this early time.

Discussion

While a participation of the ARC was established in inflammation–induced anorexia or weight loss [32-34], a contribution of LHA neurons expressing orexigenic neuropeptides like MCH or orexins could also be considered [35, 36]. Furthermore, brain CCL2/CCR2 signaling is activated by systemic LPS injection [24, 26].

Here, we demonstrated that LPS-induced behavioral and metabolic adaptation resulting in weight loss depends on the integrity of the CCR2 signaling in MCH-expressing neurons and revealed for the first time that locally produced brain chemokines may act directly on appetite–regulating neuronal networks. Brain inflammation was induced by ip and icv injections of LPS, as confirmed by an up-regulation of cytokines such as IL-1β, that followed the characteristic two wave patterns observed after peripheral LPS injection [37]. Beneficial and detrimental effects of IL-1β production have been linked to neuroinflammatory conditions and neurodegenerative diseases. The molecular steps leading to IL-1β maturation take place in an intracellular complex termed the inflammasome [38]. However the potential role of the NLRP3 inflammasome in the local production of IL-1β in the brain is not well understood [39, 40]. In spite of our results linking acute inflammation and weight loss, it is tempting to speculate a role of NLRP3 inflammasome that would be interested to further investigate.

The central inflammation was associated to a striking increase in many CCR2 ligands. Among potential candidates, CCL2 was particularly considered, based on i) its strong brain expression following systemic LPS challenges [25, 26, 41], ii) its key role in the recruitment of monocytes in the brain [42, 43] and iii) on the fact that brain inflammation following peripheral LPS injection is markedly reduced in CCL2 KO mice [24]. Furthermore, CCL2 and CCR2 are expressed in LHA neurons [22, 44], in contrast to sporadic cytokine receptors expression [13, 14]. Therefore we investigated whether CCL2 would act as intermediate between cytokines and neurons in the cascade linking inflammation to alteration of neuronal networks involved in food behavior. Firstly, its particular kinetics of activation following central LPS injection arises between inflammatory cytokines activation and down-regulation of orexigenic peptides, such as MCH and ORX. Secondly, its primary receptor, CCR2 is expressed into MCH-producing neurons leading to hypothesize that CCL2 could directly modulate MCH-neurons activity. Indeed, in mice with genetic or pharmacological CCR2 disruption, icv LPS injection was inefficient in reducing MCH mRNA. Such mandatory effect

of CCL2/CCR2 signaling on MCH gene regulation was confirmed by the full reversion of CCL2-induced MCH mRNA decrease in the CCR2 KO and INCB3344 treated mice.

CCL2 generates a hyperpolarization blocked by low barium concentration associated to an increase in membrane conductance, characteristic of activation of a GIRK current. This will tend to shunt somatic excitatory currents and block the propagation of excitatory events. Indeed, CCL2, via the direct stimulation of CCR2, depresses the frequency of discharge of evoked APs. Finally, we addressed the effect of CCL2 on the release of MCH induced by KCl-mediated depolarization [45]. We found a drastic reduction in MCH secretion by adding CCL2, an effect fully blocked by the INCB3344 antagonist.

Intriguingly, further MCH secretion induced by KCl-mediated depolarization was observed in the only presence of the INCB3344 antagonist (data not shown) suggesting that endogenous CCL2 may also contribute to the strong inhibition of MCH release. As a significant proportion of MCH neurons express both CCR2 and CCL2 and could be activated by the general depolarization induced by KCl, the locally expressed chemokine would act as a short-loop autocrine modulator amplifying the CCL2 responses driven by astrocyte activation [42, 46]. Thus both sources of brain CCL2 are likely to contribute to the inhibition of MCH secretion.

Among the myriad of mediators involved in the LPS-driven brain inflammation that modifies the activity of neurons [47-50], we demonstrated here that CCL2/CCR2 signaling could directly inhibit a major orexigenic neuronal network, i.e. the MCH neuronal pathway.

As CCL2 effects on feeding behavior and body weight were poorly investigated [51] this study is the first demonstrating selective weight loss following CCL2 icv injection in mice, an effect fully abolished in CCR2 KO mice or mice treated with the CCR2 antagonist. Interestingly, extensive analysis of the different metabolic parameters affected by central inflammation also revealed that not only food intake but also peripheral nutrient partitioning is affected by LPS injection and rely onto CCL2 signaling.

Prevention of the weight loss induced by LPS by CCR2 antagonist injection or invalidation of the CCR2 gene in transgenic mice was partial and transitory, indicating that there must be other neuronal pathways involved in this action. Indeed, LepR/γ-aminobutyric acid (GABA) expressing neurons have been shown to also regulate body-weight: leptin mainly acts on GABAergic neurons to reduce body weight, and triggers POMC neuronal activity by reducing GABA release onto these neurons. This suggested a body weight-promoting role for GABA released from leptin-inhibited neurons [52-54]. Since ORX neurons do not express CCR2, the few $MCH^{-}/CCR2^{+}$ cells we noticed in the LHA could be related to

LepR/GABA neuronal pathway. Importantly, MCH neurons are located in the LHA which is known to be a pre-ganglionic structure whose output directly affects neurons controlling autonomic output, which in turn controls peripheral substrate utilization [55]. Hence MCH neurons could relay two of the main adaptive responses triggered by central inflammation i.e reduction of appetite and loss of fat stores through enhanced fat oxidation. Paradoxically, CCR2 signaling is involved in metabolic disorders associated to obesity [56] as underlined by its role in the hyperphagic response to a high fat diet (HFD) [57], as another chemokine system, the CXCL12/CXCR4 system. Thus, these chemokine systems may have a role in mediating both neuronal and behavioral effects induced by a HFD [58]. Nevertheless, a low-grade inflammation both in the CNS and at the periphery is associated to obesity [59, 60] while sickness response is associated to high-grade inflammation (explored here), eliciting different inflammatory signaling in the CNS [61]. Therefore resolving the paradox about the central effects of CCR2 signaling would require evaluating the response of MCH neurons under conditions that promote either positive or negative energy balance.

In summary, our results demonstrate that brain LPS injection drives CCL2 synthesis that could lead to inhibition of MCH neuron activity through selective CCR2 signaling and subsequently decreases body weight/food intake. This represents the first evidence that a chemokine may directly affect a major orexigenic pathway to contribute to modulate a cardinal response of the sickness behavior.

Materials and Methods

Animals

6 to 8 weeks-old C57Bl/6J male mice (Janvier Labs, France), MCH-CFP transgenic mice (gift of Prof. J.M. Friedman, Rockefeller University, NY, USA), ORX-CFP transgenic mice (gift of Prof. C. Peyron, Lyon Neuroscience Research, France) and CCR2 KO mice (Jackson Laboratories, USA; strain number B6.129S4-Ccr2tm1Ifc/J) were housed in a room maintained at 22 ±1°C with a 12h light/12h dark cycle and were acclimatized for one week before experiments were performed. For indirect calorimetric studies, mice were housed individually in stainless steel cages. Animals had access to water and Chow diet *ad libitum* (SAFE; 2830 kcal/kg protein 21.4%, fat 5.9%, carbohydrate 51.7% #A03). All of the protocols were carried out in accordance with French standard ethical guidelines for laboratory animals and with approval of the Animal Care Committee (Nice-French Riviera, project agreement n° 04464.01).

Drugs injections and tissues collection for gene and protein analysis

Drugs were dissolved in saline solution (NaCl 0.9%) for injection. LPS (500ng; Sigma Aldrich, France), CCL2 (100ng; Peprotech, France), INCB3344 (10µM; MedChem Express, Sweden) and H6408 (10µM; Sigma Aldrich) were stereotaxically injected in WT or CCR2 KO mice, in a total volume of 5µl at a rate of 0.5µl/min as described in Stereotaxic surgery section. The localization of the injection sites was systematically controlled. Control mice received saline solution. Experimental groups were injected the same day. Mice body weight was regularly monitored until sacrifice at different times of interest after injection. Hypothalami and cerebella were dissected and processed to study mRNA (isolated according the Chomczynski method as described in [62]) and protein contents by quantitative RT-PCR and CBA, ELISA or EIA respectively (for methods details, see the Appendix Supplementary Methods). Primers for real-time quantitative PCR were designed using Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems, USA) and are detailed in Table EV1.

Immunohistochemistry experiments

MCH-CFP and ORX-CFP transgenic mice were perfused with 4% PFA and brains were collected. Phenotype of MCH-CFP and ORX-CFP neurons was determined by

immunostaining of CCR2 on 40µm thick brain floating sections of MCH-CFP and ORX-CFP mice using the anti-rabbit CCR2 antibodies (1:200, [44]), and secondary antibodies conjugated with Alexa Fluor 594 (1/500; Molecular Probes, USA). Confocal microscopy observations were performed with a Laser Scanning Confocal Microscope (TCS SP5, Leica, Germany).

Whole-cell patch-clamp recordings

Hypothalamic slices obtained from brains of 11-28 days old MCH-CFP-KI mice were studied in current-clamp experiments as we previously described [63] and detailed in the Appendix Supplementary Methods.

Perifusion of hypothalamic tissue

Three hypothalamic explants from 8 week-old male C57Bl/6J mice (coordinates: bregma -0.22 mm to -3.28 mm according to The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates of Paxinos & Franklin) were placed in each perifusion chamber in a controlled environment (37°C, 5%CO_2/95%O_2, constant flow of 0.1ml/min of MEM (no glutamine, no phenol red, no HEPES; 51200-046 Invitrogen, France) with added 20µM bacitracin (Sigma Aldrich), 1 mg/ml BSA (Sigma Aldrich), 2mM L-glutamine and proteases inhibitors Complete EDTA-free (Roche, France). After a 2-h perifusion to reach equilibrium, the sampling procedure consisted of a 30-min control basal period, a 30-min period during which drugs were added independently or in combination (60mM KCl, 100nM CCL2, 10µM INCB3344) and a 60-min wash with the medium. After each experiment, 60mM KCl was applied to control the responsiveness of hypothalamic explants. Samples were collected and immediately frozen every 10 min. MCH and ORX concentrations was measured by EIA kit (Phoenix Pharmaceuticals, USA). At least 3 experiments were carried out for each substance tested (3 chambers per group in each experiment).

Stereotaxic surgery

Mice were maintained anaesthetized through continuous isoflurane (2.5%), then infusion throughout the surgery duration. As soon as the animals were anesthetized, they received an injection of xylazine (Rompun 10 µg/g of BW, Centravet, France). Mice were implanted unilaterally with a chronic 26 stainless steel gauge guide cannula (Plastics One Inc, Roanoke, Virginia, USA) using a Kopf stereotaxic instrument (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) to allow icv injection. Unilateral implantation was made into the right lateral ventricle

(stereotaxic coordinates relative to Bregma: X: +1mm; Y: -0.34mm; Z: -2.5 mm below the surface of the skull) according to The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates of Paxinos & Franklin. Cannulas were maintained in place by dental cement anchored to one stainless steel jewellery screw fixed to the skull. A dummy 33 gauge cannula was inserted to prevent clogging of the guide cannula. At the end of the surgery, mice received an injection of ketoprofen (ketofen 10%, 10µg/g of BW, Centravet, France). After the surgery, the animals were housed individually for 7 days, during which they were handled, accustomed to the placement of the 33 gauge internal cannula and their body weight monitored daily.

Brain infusion

After 48hr acclimatization in calorimetric cages, non-restrained and conscious mice were weighted and perfused icv by using a catheter connected to the injector inserted into the guide cannula. This catheter was connected to a Hamilton syringe powered by a mini-pump KDS310 (KD Scientific, Holliston, MA, USA). Mice were accustomed to the operator by frequent handling before the experiment. The first 2 days of the experiment, all mice were perfused with vehicle solution (NaCl, Lavoisier, France) just before the onset of the dark period (18:00pm; Vt = 2.5µl; 1µl/min) for habituation. The 3rd day of the experiment, mice were divided in 3 groups and injected either with vehicle solution, LPS (500ng; Vt : 5µl), or LPS+INCB3344 (LPS: 500ng + INCB3344: 10µM; Vt: 5µl) at a rate of 1µl/min just before the onset of the dark period (18:00pm). The group injected with LPS + INCB3344 was pre-injected with INCB3344 alone (10µM; Vt: 5µl; 1µl/min) one hour before (17:00pm). Mice were monitored in calorimetric cages for 45 hours after those injections.

Indirect calorimetry Measurements

Mice were analyzed for whole energy expenditure (EE), oxygen consumption and carbon dioxide production, respiratory exchange rate (RER, CO2/O2), food intake (g) and locomotors activity (beambreak/h) using calorimetric cages with bedding, food and water (Labmaster, TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Germany) as described by Joly-Amado *et al.* (2012) [64]. Fatty acid oxidation was compiled as described by Bruss *et al*. [65].

Mice individually housed had free access to food and water *ad libitum* with lights on from 7 am to 7 pm and an ambient temperature of 22 ± 1°C. All animals were acclimated for 48 hours in calorimetric cages before experimental measurements.

Whole body composition (fat and lean mass) was measured using an Echo Medical systems' EchoMRI 100 (Whole Body Composition Analyzers, EchoMRI, Houston, USA).

Statistical Analysis

Data obtained following icv injections were analyzed with GraphPad Prism 6 using statistical tests (ANOVA and Student's unpaired two-tailed t-test). The threshold for significance was $p < 0.05$. For electrophysiology experiments, ANOVA test was used to analyze the differences between groups, followed by a Student's Newman–Keuls *post hoc* test with a threshold of significance of $p < 0.05$ using a statistical software package (SigmaStat 2.03, Jandel Sci). For indirect calorimetric studies, the results are expressed as mean ± SEM. Variance equality was analysed by Microsoft Excel's F-test and comparisons between groups were carried out using a Student's t test or by a nonparametric Mann–Whitney–Wilcoxon's test. When appropriate, analyses of variances were performed followed by a Tukey's *post hoc* test with the appropriate parameters and their interaction as factor. Data with different superscripts letters (a,b,c) differ significantly ($P<0.05$).

Expanded View for this article is available online.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr S. Mélik-Parsadaniantz and Dr A. Réaux Le Goazigo (Institut de la Vision, UMRS 968, Paris) for the gift of the anti-rabbit CCR2 antibody, F. Massa, S. Berthezène and L. Lucas for their technical support. This work was supported by the CNRS, the Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20150331738 to J.L.N. and DRM20101220421 to N.B. and C.R.) and by the French Government (National Research Agency, ANR) through the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE: program reference # ANR-11-LABX-0028-01.

Author contributions

C.R., N.B. and J.L.N. conceived and supervised the study, designed experiments, and wrote the manuscript. C.R., N.B. designed and performed the majority of the experiments, interpreted results and generated figures and tables. O.L.T. participated to most experiments, developing notably the perifusion set-up with W.R., interpreted results, generated figures and tables. C.C. performed indirect calorimetric measurements, spontaneous activity and feeding analyses with R.D. S.L. contributed to data analysis of indirect calorimetric experiments and paper writing. M.B. performed immunohistochemistry experiments, N.D. participated to physiology experiments and weight measurements of mice, A.G. performed and analyzed results from electrophysiology experiments, J.C. contributed to the fax-array analysis and all other authors discussed results and/or reviewed the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kent S, Bluthe RM, Kelley KW, Dantzer R (1992) Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci* **13**: 24-8
2. McCusker RH, Kelley KW (2013) Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. *J Exp Biol* **216**: 84-98
3. Plata-Salaman CR (2001) Cytokines and feeding. *Int J Obes Relat Metab Disord* **25 Suppl 5**: S48-52
4. Konsman JP, Dantzer R (2001) How the immune and nervous systems interact during disease-associated anorexia. *Nutrition* **17**: 664-8
5. Serrats J, Schiltz JC, Garcia-Bueno B, van Rooijen N, Reyes TM, Sawchenko PE (2010) Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. *Neuron* **65**: 94-106
6. Dantzer R (2004) Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur J Pharmacol* **500**: 399-411
7. Konsman JP, Parnet P, Dantzer R (2002) Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. *Trends Neurosci* **25**: 154-9
8. Wisse BE, Ogimoto K, Tang J, Harris MK, Jr., Raines EW, Schwartz MW (2007) Evidence that lipopolysaccharide-induced anorexia depends upon central, rather than peripheral, inflammatory signals. *Endocrinology* **148**: 5230-7
9. Chakravarty S, Herkenham M (2005) Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neurosci* **25**: 1788-96
10. Sohn JW, Elmquist JK, Williams KW (2013) Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. *Trends Neurosci* **36**: 504-12
11. Swanson LW, Sanchez-Watts G, Watts AG (2005) Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mRNA expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. *Neurosci Lett* **387**: 80-4
12. Schneeberger M, Gomis R, Claret M (2014) Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J Endocrinol* **220**: T25-46
13. Ericsson A, Liu C, Hart RP, Sawchenko PE (1995) Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. *J Comp Neurol* **361**: 681-98
14. Hanisch UK, Rowe W, van Rossum D, Meaney MJ, Quirion R (1996) Phasic hyperactivity of the HPA axis resulting from chronic central IL-2 administration. *Neuroreport* **7**: 2883-8
15. Callewaere C, Banisadr G, Rostene W, Parsadaniantz SM (2007) Chemokines and chemokine receptors in the brain: implication in neuroendocrine regulation. *J Mol Endocrinol* **38**: 355-63
16. Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE (1992) The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *J Comp Neurol* **319**: 218-45.
17. Leibowitz SF, Wortley KE (2004) Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides* **25**: 473-504
18. Nahon JL (2006) The melanocortins and melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior and energy homeostasis. *C R Biol* **329**: 623-38; discussion 653-5
19. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richarson JA, Kozlowski GP, Wilson S, *et al.* (1998) Orexins and orexin receptors: a family

of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* **92**: 1 page following 696
20. Huang Q, Viale A, Picard F, Nahon J, Richard D (1999) Effects of leptin on melanin-concentrating hormone expression in the brain of lean and obese Lep(ob)/Lep(ob) mice. *Neuroendocrinology* **69**: 145-53
21. de Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X, Foye PE, Danielson PE, Fukuhara C, Battenberg EL, Gautvik VT, Bartlett FS, 2nd, *et al.* (1998) The hypocretins: hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 322-7
22. Banisadr G, Gosselin RD, Mechighel P, Kitabgi P, Rostene W, Parsadaniantz SM (2005) Highly regionalized neuronal expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in rat brain: evidence for its colocalization with neurotransmitters and neuropeptides. *J Comp Neurol* **489**: 275-92
23. Rostene W, Kitabgi P, Parsadaniantz SM (2007) Chemokines: a new class of neuromodulator? *Nat Rev Neurosci* **8**: 895-903
24. Thompson WL, Karpus WJ, Van Eldik LJ (2008) MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. *J Neuroinflammation* **5**: 35
25. Skelly DT, Hennessy E, Dansereau MA, Cunningham C (2013) A systematic analysis of the peripheral and CNS effects of systemic LPS, IL-1beta, [corrected] TNF-alpha and IL-6 challenges in C57BL/6 mice. *PLoS One* **8**: e69123
26. Cazareth J, Guyon A, Heurteaux C, Chabry J, Petit-Paitel A (2014) Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *J Neuroinflammation* **11**: 132
27. Conductier G, Blondeau N, Guyon A, Nahon JL, Rovere C (2010) The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *J Neuroimmunol* **224**: 93-100
28. Brodmerkel CM, Huber R, Covington M, Diamond S, Hall L, Collins R, Leffet L, Gallagher K, Feldman P, Collier P, *et al.* (2005) Discovery and pharmacological characterization of a novel rodent-active CCR2 antagonist, INCB3344. *J Immunol* **175**: 5370-8
29. Guyon A, Conductier G, Rovere C, Enfissi A, Nahon JL (2009) Melanin-concentrating hormone producing neurons: Activities and modulations. *Peptides* **30**: 2031-9
30. Stanley S, Pinto S, Segal J, Perez CA, Viale A, DeFalco J, Cai X, Heisler LK, Friedman JM (2010) Identification of neuronal subpopulations that project from hypothalamus to both liver and adipose tissue polysynaptically. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 7024-9
31. Conductier G, Brau F, Viola A, Langlet F, Ramkumar N, Dehouck B, Lemaire T, Chapot R, Lucas L, Rovere C, *et al.* (2013) Melanin-concentrating hormone regulates beat frequency of ependymal cilia and ventricular volume. *Nat Neurosci* **16**: 845-7
32. Reyes TM, Sawchenko PE (2002) Involvement of the arcuate nucleus of the hypothalamus in interleukin-1-induced anorexia. *J Neurosci* **22**: 5091-9
33. Ogimoto K, Harris MK, Jr., Wisse BE (2006) MyD88 is a key mediator of anorexia, but not weight loss, induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 beta. *Endocrinology* **147**: 4445-53
34. Ruud J, Nilsson A, Engstrom Ruud L, Wang W, Nilsberth C, Iresjo BM, Lundholm K, Engblom D, Blomqvist A (2013) Cancer-induced anorexia in tumor-bearing mice is dependent on cyclooxygenase-1. *Brain Behav Immun* **29**: 124-35
35. Gaykema RP, Goehler LE (2009) Lipopolysaccharide challenge-induced suppression of Fos in hypothalamic orexin neurons: their potential role in sickness behavior. *Brain Behav Immun* **23**: 926-30

36. Grossberg AJ, Zhu X, Leinninger GM, Levasseur PR, Braun TP, Myers MG, Jr., Marks DL (2011) Inflammation-induced lethargy is mediated by suppression of orexin neuron activity. *J Neurosci* **31**: 11376-86
37. Quan N, Whiteside M, Herkenham M (1998) Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. *Neuroscience* **83**: 281-93
38. Martinon F, Burns K, Tschopp J (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **10**: 417-26
39. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, Fitzgerald KA, Latz E, Moore KJ, Golenbock DT (2008) The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* **9**: 857-65
40. Inoue M, Shinohara ML (2013) NLRP3 Inflammasome and MS/EAE. *Autoimmune Dis* **2013**: 859145
41. Brown CM, Mulcahey TA, Filipek NC, Wise PM (2010) Production of proinflammatory cytokines and chemokines during neuroinflammation: novel roles for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **151**: 4916-25
42. Carrillo-de Sauvage MA, Gomez A, Ros CM, Ros-Bernal F, Martin ED, Perez-Valles A, Gallego-Sanchez JM, Fernandez-Villalba E, Barcia C, Sr., Barcia C, Jr*., et al.* (2012) CCL2-expressing astrocytes mediate the extravasation of T lymphocytes in the brain. Evidence from patients with glioma and experimental models in vivo. *PLoS One* **7**: e30762
43. Schellenberg AE, Buist R, Del Bigio MR, Toft-Hansen H, Khorooshi R, Owens T, Peeling J (2012) Blood-brain barrier disruption in CCL2 transgenic mice during pertussis toxin-induced brain inflammation. *Fluids Barriers CNS* **9**: 10
44. Banisadr G, Queraud-Lesaux F, Boutterin MC, Pelaprat D, Zalc B, Rostene W, Haour F, Parsadaniantz SM (2002) Distribution, cellular localization and functional role of CCR2 chemokine receptors in adult rat brain. *J Neurochem* **81**: 257-69
45. Sekiya K, Ghatei MA, Lacoumenta S, Burnet PW, Zamir N, Burrin JM, Polak JM, Bloom SR (1988) The distribution of melanin-concentrating hormone-like immunoreactivity in the central nervous system of rat, guinea-pig, pig and man. *Neuroscience* **25**: 925-30
46. Morrone SR, Wang T, Constantoulakis LM, Hooy RM, Delannoy MJ, Sohn J (2014) Cooperative assembly of IFI16 filaments on dsDNA provides insights into host defense strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: E62-71
47. Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A (2004) Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* **7**: 613-20
48. Block ML, Hong JS (2005) Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol* **76**: 77-98
49. Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, Bezzi P, Santello M, Domercq M, Matute C, Tonello F, Gundersen V, Volterra A (2007) Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci* **10**: 331-9
50. Mariotto S, Suzuki Y, Persichini T, Colasanti M, Suzuki H, Cantoni O (2007) Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. *Curr Med Chem* **14**: 1940-4
51. Plata-Salaman CR, Borkoski JP (1994) Chemokines/intercrines and central regulation of feeding. *Am J Physiol* **266**: R1711-5
52. Elmquist JK, Coppari R, Balthasar N, Ichinose M, Lowell BB (2005) Identifying hypothalamic pathways controlling food intake, body weight, and glucose homeostasis. *J Comp Neurol* **493**: 63-71
53. Morris MJ, Chen H (2009) Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth. *Int J Obes (Lond)* **33**: 115-22

54. Xu Y, O'Brien WG, 3rd, Lee CC, Myers MG, Jr., Tong Q (2012) Role of GABA release from leptin receptor-expressing neurons in body weight regulation. *Endocrinology* **153**: 2223-33
55. Joly-Amado A, Cansell C, Denis RG, Delbes AS, Castel J, Martinez S, Luquet S (2014) The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **28**: 725-37
56. Panee J (2012) Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine* **60**: 1-12
57. Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. (2006) CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* **116**: 115-24
58. Poon K, Barson JR, Ho HT, Leibowitz SF (2016) Relationship of the Chemokine, CXCL12, to Effects of Dietary Fat on Feeding-Related Behaviors and Hypothalamic Neuropeptide Systems. *Front Behav Neurosci* **10**: 51
59. Gregor MF, Hotamisligil GS (2011) Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* **29**: 415-45
60. Velloso LA, Araujo EP, de Souza CT (2008) Diet-induced inflammation of the hypothalamus in obesity. *Neuroimmunomodulation* **15**: 189-93
61. Thaler JP, Choi SJ, Sajan MP, Ogimoto K, Nguyen HT, Matsen M, Benoit SC, Wisse BE, Farese RV, Schwartz MW (2009) Atypical protein kinase C activity in the hypothalamus is required for lipopolysaccharide-mediated sickness responses. *Endocrinology* **150**: 5362-72
62. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-9
63. Guyon A, Banisadr G, Rovere C, Cervantes A, Kitabgi P, Melik-Parsadaniantz S, Nahon JL (2005) Complex effects of stromal cell-derived factor-1 alpha on melanin-concentrating hormone neuron excitability. *Eur J Neurosci* **21**: 701-10
64. Joly-Amado A, Denis RG, Castel J, Lacombe A, Cansell C, Rouch C, Kassis N, Dairou J, Cani PD, Ventura-Clapier R*, et al.* Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning. *EMBO J* **31**: 4276-88
65. Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, Aggarwal I, Hellerstein MK (2010) Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **298**: E108-16

Figure legends

Figure 1. Analysis of inflammatory markers expression in LPS icv injected mice.

A Dose-response relationship between icv LPS injection and mice weight loss (n=6 to 12). Data are expressed as means ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, color-coded asterisks indicate a significant difference from the experimental condition assigned to the respective color-coded curve.

B, C Analysis by real-time PCR Arrays of interleukins, cytokines (B) and CC chemokine ligands and receptors (C) gene expression in the hypothalamus 6h after an acute icv injection of LPS vs saline in WT mice (n=6 per group). LPS-induced fold up-regulation vs saline condition was calculated using the $\Delta\Delta C_T$ method according to the manufacturer's protocol.

Data are expressed as means ± SEM. *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001.

See also Figure EV1

Figure 2. LPS decreases body weight, food intake and increase fat oxidation activity through a CCR2-dependent mechanism.

A % of weight variation compared to initial body weight at different times (from 2 to 48h) after acute icv injection of saline (black curve), INCB3344 (grey curve), LPS (red curve) or LPS+INCB3344 (blue curve) in WT mice (n=6 to 12).

B Fold increase in weight-loss compare to appropriate saline injected control 26h after acute icv injection of LPS (red bar) or LPS+INCB3344 (blue bar) in WT mice or LPS (striped bar) in CCR2 KO mice (n=6).

C Fold increase in weight-loss compare to appropriate saline injected control 26h after acute icv injection of CCL2 in WT mice (orange bar) or in CCR2 KO mice (striped bar) (n=6).

D, F Variation of food intake (D) and Fat oxidation (F) recorded for 45h during light and dark period (grey area) after acute icv injection of saline (black curve), LPS (red curve) or LPS+INCB3344 (blue curve) in WT mice (n=5-8).

E, G Food intake (E) and Fat oxidation (G) average over 4 periods of 12 hours after acute icv injection of saline (black bars), LPS (red bars) or LPS+INCB3344 (blue bars) in WT mice (n=5-8).

Data are expressed as means ± SEM. *, $,# p<0.05; **,$$,## p<0.01 and ***,$$$,### p<0.001. * compare saline and LPS conditions; $ compare saline and LPS+INCB3344

conditions and # compare LPS and LPS+INCB3344 conditions. a, b, and c differ significantly ($p < 0.05$).

See also Figures EV2, Appendix Figure S1 and Appendix Table S1.

Figure 3. Brain-injected LPS induced differential variations in hypothalamic expression of cytokines and of the orexigenic neuropeptide MCH.

A Real-time PCR analysis of the genes coding for the pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-6, TNF-α in the hypothalamus of LPS icv injected mice at different times after injection (from 1h to 18h), normalized to values in saline icv injected mice (n=6 per group).

B-E Study of gene and protein hypothalamic expression of the chemokine CCL2 (B, C) and MCH peptide (D, E) in LPS icv injected mice. Real-time PCR analysis for CCL2 (B) and MCH (D) at different times after injection (from 1h to 24h), normalized to values in control saline icv injected mice (n=6 per group). Measurement of CCL2 (C) and MCH (E) concentration by EIA after LPS icv injection (black bars) or saline icv injection (grey bars) in mice at 1h, 6h and 18h after injection. Cerebellum was used as negative control (3 independent experiments, n=6 per group in each experiment).

Data are expressed as means ± SEM. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$, LPS icv injection vs saline icv injection.

F The decrease in MCH mRNA levels observed 18h after LPS icv injection is partly abolished by the CCR2 antagonist INCB3344 (10μM) and in CCR2 KO mice, as shown by real-time PCR analysis for MCH in the hypothalamus. Results were normalized to values in saline icv injected WT mice (n=6 per group). Data are expressed as means ± SEM. ** or $$ $p<0.01$. * saline vs LPS icv injection in WT mice. $ LPS icv injection in WT mice vs LPS+INCB3344 icv injection in WT mice or LPS icv injection in CCR2 KO mice.

See also Figures EV3 and EV4.

Figure 4. Brain-injected CCL2 altered the expression of pro-inflammatory cytokines and of the orexigenic neuropeptide MCH in the hypothalamus.

A Real-time PCR analysis of the genes coding for the pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-6, TNF-α in the hypothalamus of CCL2 icv injected mice at different times after injection (from 1h to 18h), normalized to values in saline icv injected mice (n = 6 per group).

B-E Study of gene and protein hypothalamic expression of the chemokine CCL2 (B, C) and MCH peptide (D, E) in CCL2 icv injected mice. Real-time PCR analysis for CCL2 (B)

and MCH (D) at different times after injection (from 1h to 24h), normalized to values in control saline icv injected mice (n = 6 per group). Measurement of CCL2 (C) and MCH (E) concentration by EIA after CCL2 icv injection (black bars) or saline icv injection (grey bars) in mice at 1h, 6h and 18h after injection. Cerebellum was used as negative control (3 independent experiments, n=6 per group in each experiment).

Data are expressed as means ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, CCL2 icv injection vs saline icv injection.

F The decrease in MCH mRNA levels observed 18h after CCL2 icv injection is abolished by the CCR2 antagonist INCB3344 (10µM) and in CCR2 KO mice, as shown by real-time PCR analysis for MCH in the hypothalamus. Results were normalized to values in saline icv injected WT mice (n=6 per group). Data are expressed as means ± SEM. ** or $$ p<0.01. * saline vs CCL2 icv injection in WT mice. $ CCL2 icv injection in WT mice vs CCL2+INCB3344 icv injection in WT mice or CCL2 icv injection in CCR2 KO mice.

See also Figure EV4.

Figure 5. The chemokine CCL2 can directly modulate MCH neurons.

A Colocalization of MCH and the receptor for CCL2 (CCR2) in the LHA of mice expressing CFP under the promoter of MCH. The overlap of MCH and CCR2 immunoreactivity indicates that CCR2 is expressed on MCH neurons in the LHA.

B, D CCL2 effects on MCH neurons of MCH-CFP knock-in mice recorded in current-clamp mode. Representative trace of the effects of CCL2 on MCH neurons (B). The CCR2 antagonist INCB3344 prevents the small hyperpolarization of MCH neurons elicited by CCL2. Effects of CCL2 at various concentrations, alone or in the presence of the INCB3344 (1µM) or barium (200µM) on the membrane potential of MCH neurons (n= 5 to 16) (C). ** p<0.01, *** p< 0.001, t test after ANOVA; + p<0.05, ++ p<0.01 paired t test, against their own control. Data are expressed as means ± SEM. Discharge pattern of two representative MCH neurons in response to a depolarizing current pulse injection (current pulses applied every 10s) in control condition and in the presence of CCL2 (D). The control trace is recorded just before the application of CCL2 while the CCL2 trace is recorded 1 min after the beginning of CCL2 application. CCL2 delayed the third action potential (left panel) and induced failures in the action potential evoked in the right panel.

E Effect of CCL2 on KCl-induced MCH release. The perifusion of hypothalamic tissues with 60mM KCl for 30 min induces an up to 3.1-fold increase in MCH release. CCL2 (100 nM) dramatically blunts KCl-induced MCH release, an effect partially by the addition of

INCB3344 (10µM) (3 to 5 independent experiments, 3 chambers per condition in each experiment). * or $ $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$. * KCl vs KCl+CCL2 conditions. $ KCl+CCL2 vs KCl+CCL2+INCB3344 conditions. Data are expressed as mean fold-increase in MCH release per chamber vs basal secretion, ± SEM.

F Effect on MCH-R1 antagonist on LPS- and CCL2-induced weight loss. Data are expressed in mean % of weight variation compared to initial body weight at different times (from 2 to 48h) after acute icv injection of saline (black bar), H6408 (dark blue bar), LPS (red bar), or LPS+H6408 (light red bar), CCL2 (orange bar), CCL2+H6408 (yellow bar) in WT mice (n=3 to 12). Data are expressed as means ± SEM. *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$, color-coded asterisks indicate a significant difference from the experimental condition assigned to the respective color-coded bar.

See also Figures EV4 and EV5.

Expanded View Figure and Table Legends

Figure EV1. Study of weight loss and gene expression of the hypothalamic expression of cytokines, chemokines and neuropeptides in LPS ip injected mice.

A Dose-response relationship between ip LPS injection and mice weight loss (n=6 to 15). Data are expressed as means ± SEM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, color-coded asterisks indicate a significant difference from the experimental condition assigned to the respective color-coded curve.

B, E Real-time PCR analysis of the genes coding for the pro-inflammatory cytokines IL-1β, IL-6, TNF-α (B), the CCL2 chemokine (C) and the hypothalamic peptides POMC, CART, NPY, AgRP (D), MCH and ORX (E) in LPS icv injected mice at different times after injection (from 1h to 48h), normalized to values in saline ip injected mice (n = 6 per group). Data are expressed as means ± SEM. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, LPS condition vs saline condition.

See also Figures 1 and 3.

Figure EV2. Injection of CCR2 antagonist reverses LPS effects on locomotor activity and respiratory quotient.

A, C, E Variation of locomotor activity (A), energy expenditure (C) and respiratory quotient (E) recorded for 45h during light and dark period (grey bar) after acute icv injection of saline (black curve), LPS (red curve) or LPS+INCB3344 (blue curve) in WT mice (n=5-8).

B, D, F Locomotor activity (B), energy expenditure (D) and respiratory quotient (F) average for periods of 12 hours after acute icv injection of saline (black bars), LPS (red bars) or LPS+INCB3344 (blue bars) in WT mice (n=5-8). Data are expressed as means ± SEM. *,$,# p<0.05. * compare saline and LPS conditions; $ compare saline and LPS+INCB3344 conditions and # compare LPS and LPS+INCB3344 conditions. a, b, and c differ significantly (p < 0.05).

See also Figure 2.

Figure EV3. Study of gene expression of the ARC peptides in LPS icv injected mice.

A-D Real-time PCR analysis of the genes coding for the hypothalamic peptides POMC (A), CART (B), NPY (C) and AgRP (D) in LPS icv injected mice at different times after injection (from 1h to 24h), normalized to values in saline icv injected mice (n=6 per group). * p<0.05,

** $p<0.01$, *** $p<0.001$, LPS condition vs saline condition. Data are expressed as means ± SEM.

See also Figures 1 and 3.

Figure EV4. **Expression and effect of CCL2 on ORX neurons.**

A-D Study of gene and protein expression of the hypothalamic peptide ORX in LPS (A, B) or CCL2 (C, D) icv injected mice. Real-time PCR analysis for ORX in LPS (A) or CCL2 (C) icv injected mice at different times after injection (from 1h to 24h), normalized to values in control saline icv injected mice (n=6 per group); measurement of ORX concentration by EIA after LPS (B) or CCL2 (D) icv injection (black bars) or saline icv injection (grey bars) in mice at 1h, 6h and 18h after injection (3 independent experiments, n = 6 per group in each experiment). Cerebellum was used as negative control.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, CCL2 condition vs saline condition. Data are expressed as means ± SEM.

E Immunohistochemistry experiments in the LHA of mice expressing CFP under the promoter of ORX. CCR2 is not expressed by ORX neurons.

F Perifusion of hypothalamic tissues. Application of CCL2 had no effect on KCl-induced ORX release (3 to 5 independent experiments, 3 chambers per condition in each experiment). Data are expressed as mean fold-increase in ORX release per chamber vs basal secretion, ± SEM.

See also Figures 3, 4, 5.

Figure EV5. **Effects of CCL2 on MCH neurons of the LHA recorded in brain slices from MCH-CFP knock-in mice.**

A, B MCH neurons were recorded in voltage-clamp using the KCl solution (trace filtered at 0.25 kHz) (n = 4). Example of the inward current induced by a local application of CCL2 (A). Rapid inward deflections were due to spontaneous activity and vertical bars represent the currents in response to hyperpolarizing steps of -10 mV from -60mV during 300ms every 10s, as extended on the inset on top in the absence (1) and in the presence of CCL2 (2). Effect of CCL2 on the absolute value of the instantaneous current amplitude (ΔI) plotted against time of the cell presented in A (B).

C, D Effect of CCL2 on the spontaneous post-synaptic currents recorded on MCH neurons. Example of recordings obtained in whole-cell voltage-clamp on a MCH neuron maintained at a holding potential of -60mV before (control), during the application of CCL2 (10nM CCL2)

or after CCL2 has been washed out (washout) (C). Inset shows an example of event with an expanded time scale. The decay has been fitted to a single exponential. Effect of 10nM CCL2 on the frequency (left) and amplitude (right) of post-synaptic currents (PSCs) (D). Individual cells are indicated by circles and thin lines (n = 5). *$p<0.05$. 10nM CCL2 vs control condition. Data are expressed as means ± SEM.

See also Figure 5.

Table EV1. Primers used for real time PCR.

Forward and reverse primers were designed using Primer Express software. Genes were analyzed with a SYBR® Green I system.

Appendix data

Appendix Figure S1. LPS decreases body weight, through a CCR2-dependent mechanism.

Weight variation (g) compared to initial body weight at different times (from 2 to 48h) after acute icv injection of saline (black curve), INCB3344 (grey curve), LPS (red curve) or LPS+INCB3344 (blue curve) in WT mice (n=6-12).

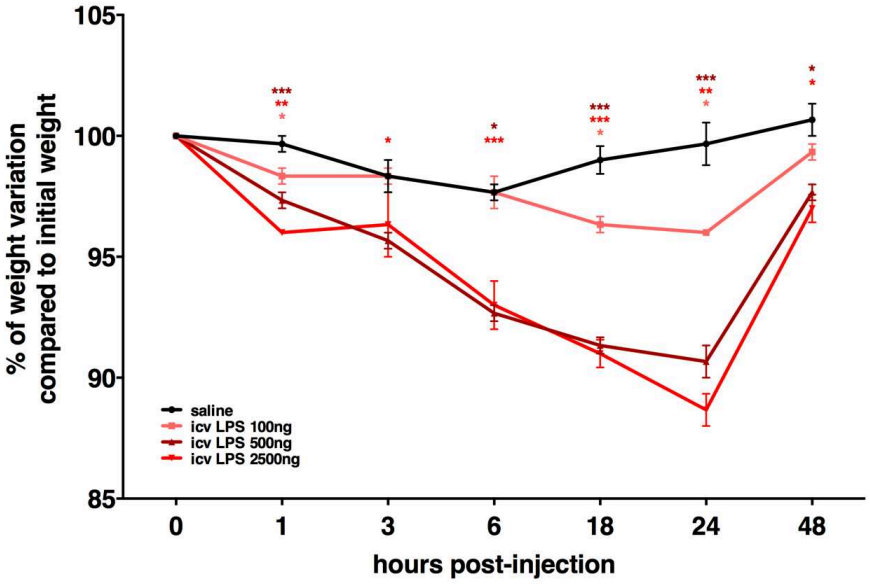
Data are expressed as means ± SEM. *, $,# $p<0.05$; **,$$,## $p<0.01$ and ***,$$$,### $p<0.001$. * compare saline and LPS conditions; $ compare saline and LPS+INCB3344 conditions and # compare LPS and LPS+INCB3344 conditions. a, b, and c differ significantly ($p < 0.05$).

See Figure 2.

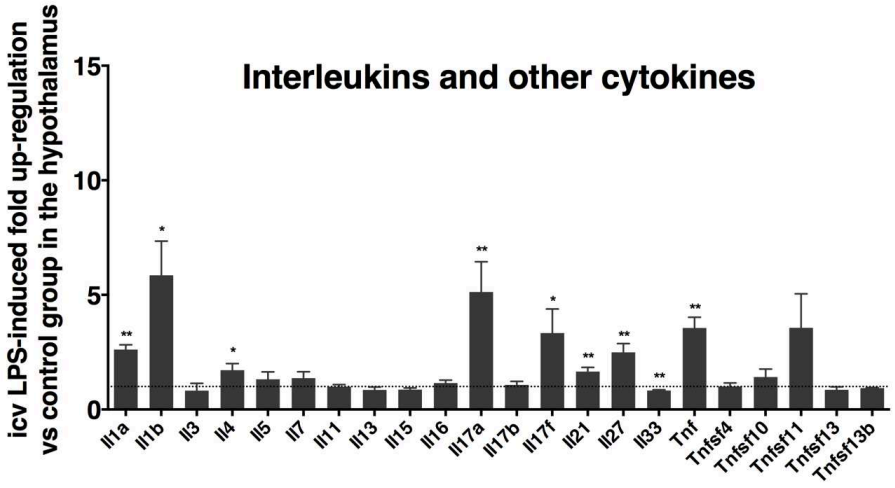
Appendix Table S1. Raw values of weight variation (g) at different times (from 2 to 48h) after acute icv injection of saline (n=12), INCB3344 (n=9), LPS (n=6) or LPS+INCB3344 (n=6) in WT mice.

See Figure 2.

A


% of weight variation compared to initial weight
105
100
95
90
85
0
1
3
6
18
24
48
hours post-injection
saline
icv LPS 100ng
icv LPS 500ng
icv LPS 2500ng

B


Interleukins and other cytokines
icv LPS-induced fold up-regulation vs control group in the hypothalamus
15
10
5
0
Il1a
Il1b
Il3
Il4
Il5
Il7
Il11
Il13
Il15
Il16
Il17a
Il17b
Il17f
Il21
Il27
Il33
Tnf
Tnfsf4
Tnfsf10
Tnfsf11
Tnfsf13
Tnfsf13b

C

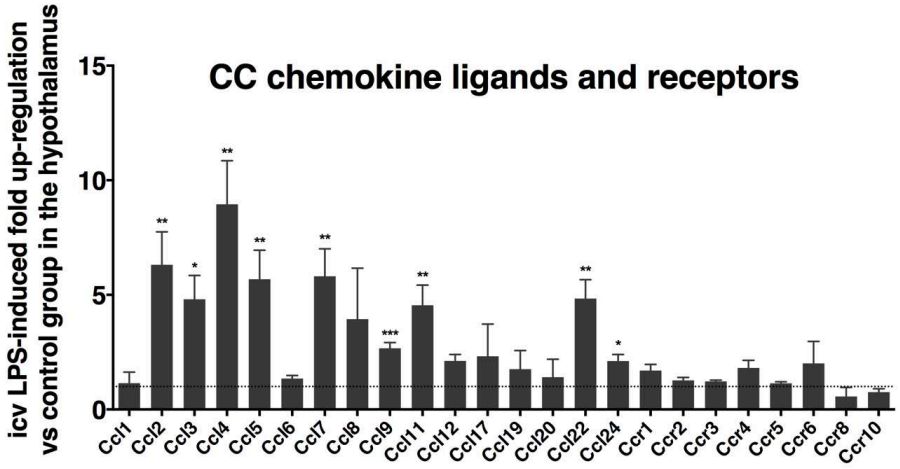

CC chemokine ligands and receptors
icv LPS-induced fold up-regulation vs control group in the hypothalamus
15
10
5
0
Ccl1
Ccl2
Ccl3
Ccl4
Ccl5
Ccl6
Ccl7
Ccl8
Ccl9
Ccl11
Ccl12
Ccl17
Ccl19
Ccl20
Ccl22
Ccl24
Ccr1
Ccr2
Ccr3
Ccr4
Ccr5
Ccr6
Ccr8
Ccr10

Figure 1

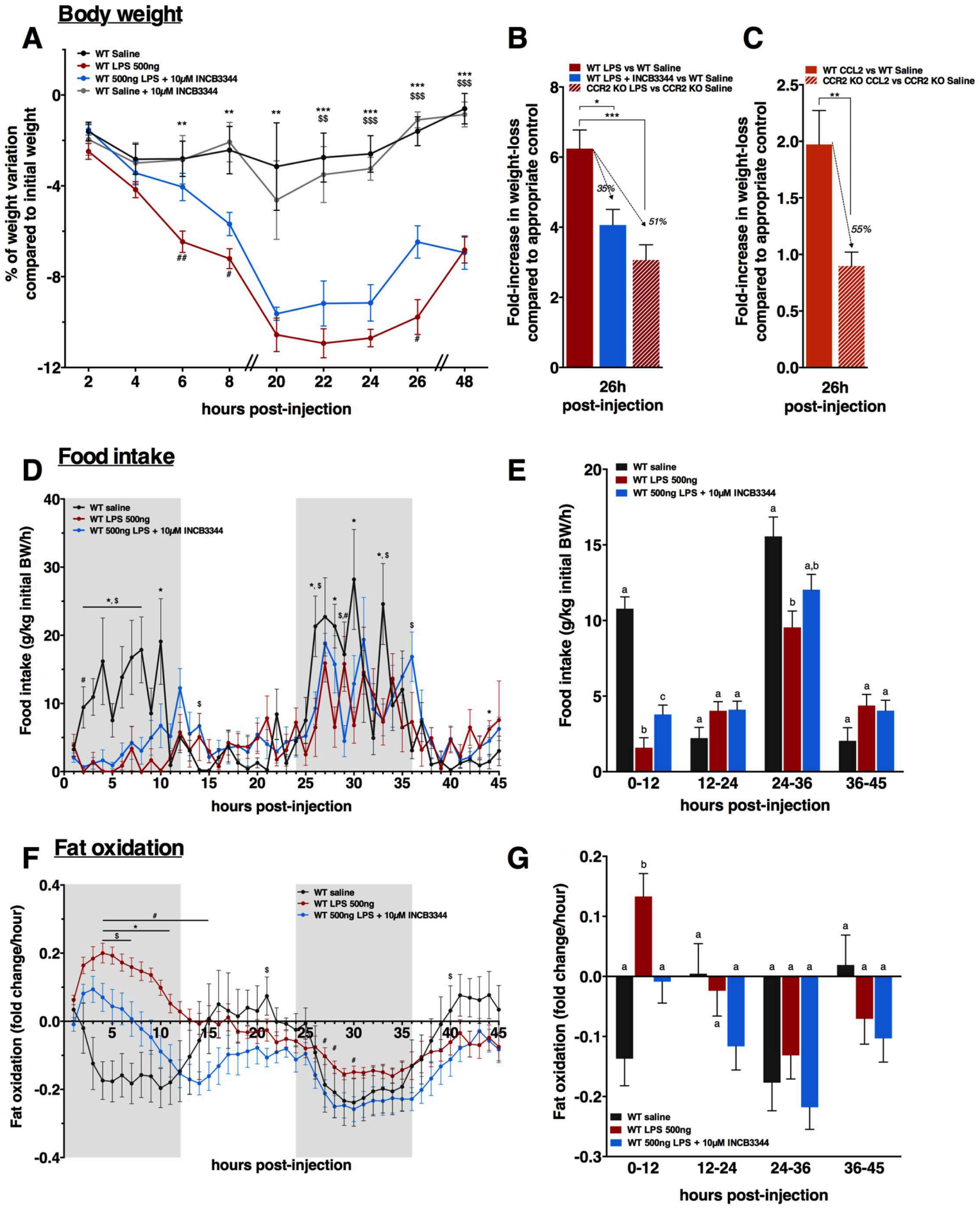

Body weight
A
WT Saline
WT LPS 500ng
WT 500ng LPS + 10μM INCB3344
WT Saline + 10μM INCB3344
% of weight variation compared to initial weight
hours post-injection
B
WT LPS vs WT Saline
WT LPS + INCB3344 vs WT Saline
CCR2 KO LPS vs CCR2 KO Saline
Fold-increase in weight-loss compared to appropriate control
35%
51%
26h post-injection
C
WT CCL2 vs WT Saline
CCR2 KO CCL2 vs CCR2 KO Saline
55%
26h post-injection
Food intake
D
WT saline
WT LPS 500ng
WT 500ng LPS + 10μM INCB3344
Food intake (g/kg initial BW/h)
hours post-injection
E
0-12
12-24
24-36
36-45
Fat oxidation
F
Fat oxidation (fold change/hour)
G

Figure 2

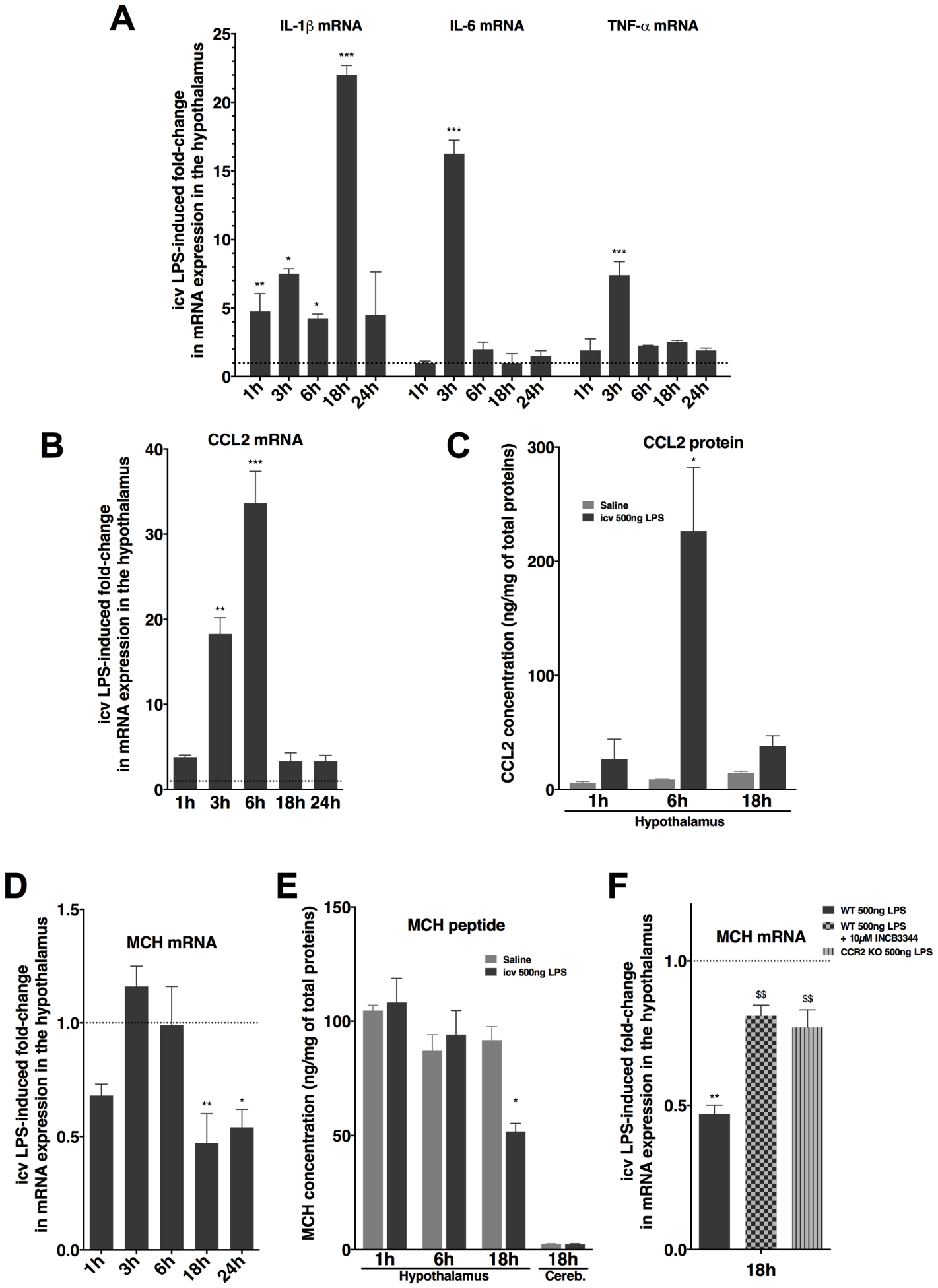

A
IL-1β mRNA
IL-6 mRNA
TNF-α mRNA
icv LPS-induced fold-change in mRNA expression in the hypothalamus
1h
3h
6h
18h
24h
B
CCL2 mRNA
icv LPS-induced fold-change in mRNA expression in the hypothalamus
C
CCL2 protein
CCL2 concentration (ng/mg of total proteins)
Saline
icv 500ng LPS
Hypothalamus
D
MCH mRNA
icv LPS-induced fold-change in mRNA expression in the hypothalamus
E
MCH peptide
MCH concentration (ng/mg of total proteins)
Saline
icv 500ng LPS
Hypothalamus
Cereb.
F
MCH mRNA
icv LPS-induced fold-change in mRNA expression in the hypothalamus
WT 500ng LPS
WT 500ng LPS + 10μM INCB3344
CCR2 KO 500ng LPS
18h

Figure 3

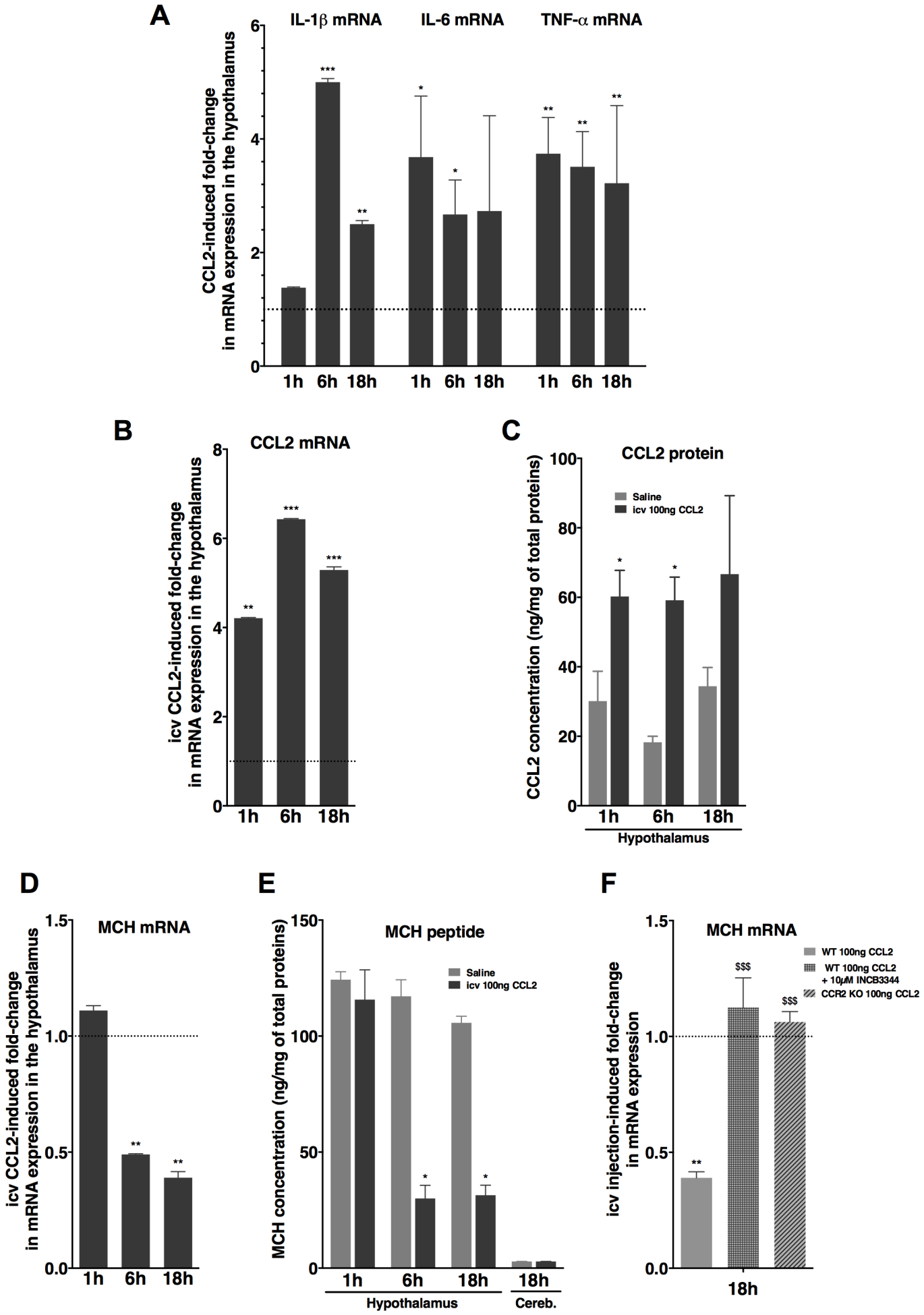

A
IL-1β mRNA
IL-6 mRNA
TNF-α mRNA
CCL2-induced fold-change in mRNA expression in the hypothalamus
1h 6h 18h 1h 6h 18h 1h 6h 18h
B
CCL2 mRNA
icv CCL2-induced fold-change in mRNA expression in the hypothalamus
1h 6h 18h
C
CCL2 protein
Saline
icv 100ng CCL2
CCL2 concentration (ng/mg of total proteins)
1h 6h 18h
Hypothalamus
D
MCH mRNA
icv CCL2-induced fold-change in mRNA expression in the hypothalamus
1h 6h 18h
E
MCH peptide
Saline
icv 100ng CCL2
MCH concentration (ng/mg of total proteins)
1h 6h 18h 18h
Hypothalamus
Cereb.
F
MCH mRNA
WT 100ng CCL2
WT 100ng CCL2 + 10μM INCB3344
CCR2 KO 100ng CCL2
icv injection-induced fold-change in mRNA expression
18h

Figure 4

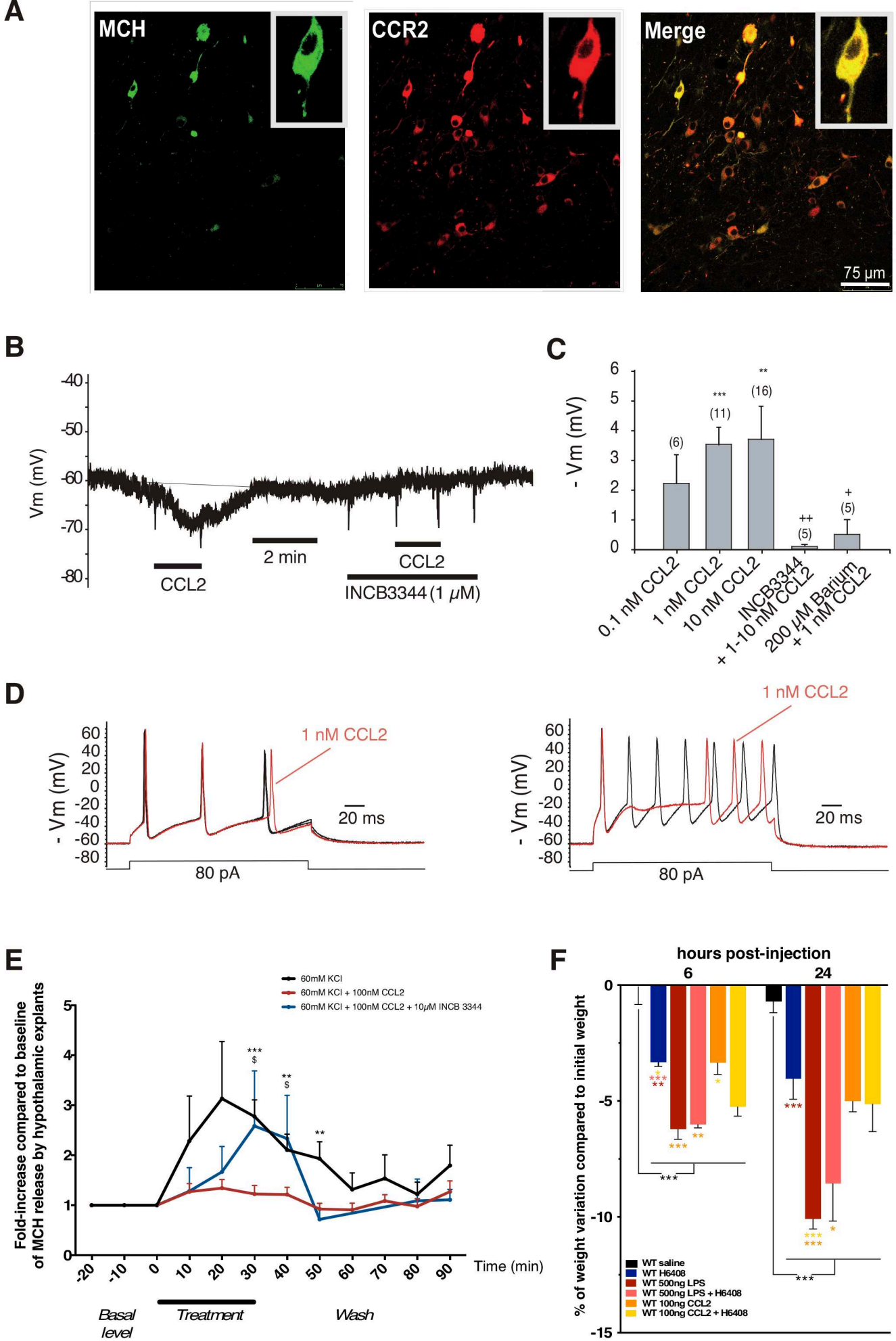

A
MCH
CCR2
Merge
75 µm
B
Vm (mV)
-40
-50
-60
-70
-80
CCL2
2 min
CCL2
INCB3344 (1 µM)
C
- Vm (mV)
(6)
(11)
(16)
(5)
(5)
0.1 nM CCL2
1 nM CCL2
10 nM CCL2
INCB3344 + 1-10 nM CCL2
200 µM Barium + 1 nM CCL2
D
- Vm (mV)
1 nM CCL2
20 ms
80 pA
E
Fold-increase compared to baseline of MCH release by hypothalamic explants
60mM KCl
60mM KCl + 100nM CCL2
60mM KCl + 100nM CCL2 + 10µM INCB 3344
Time (min)
Basal level
Treatment
Wash
F
hours post-injection
6
24
% of weight variation compared to initial weight
WT saline
WT H6408
WT 500ng LPS
WT 500ng LPS + H6408
WT 100ng CCL2
WT 100ng CCL2 + H6408

Figure 5

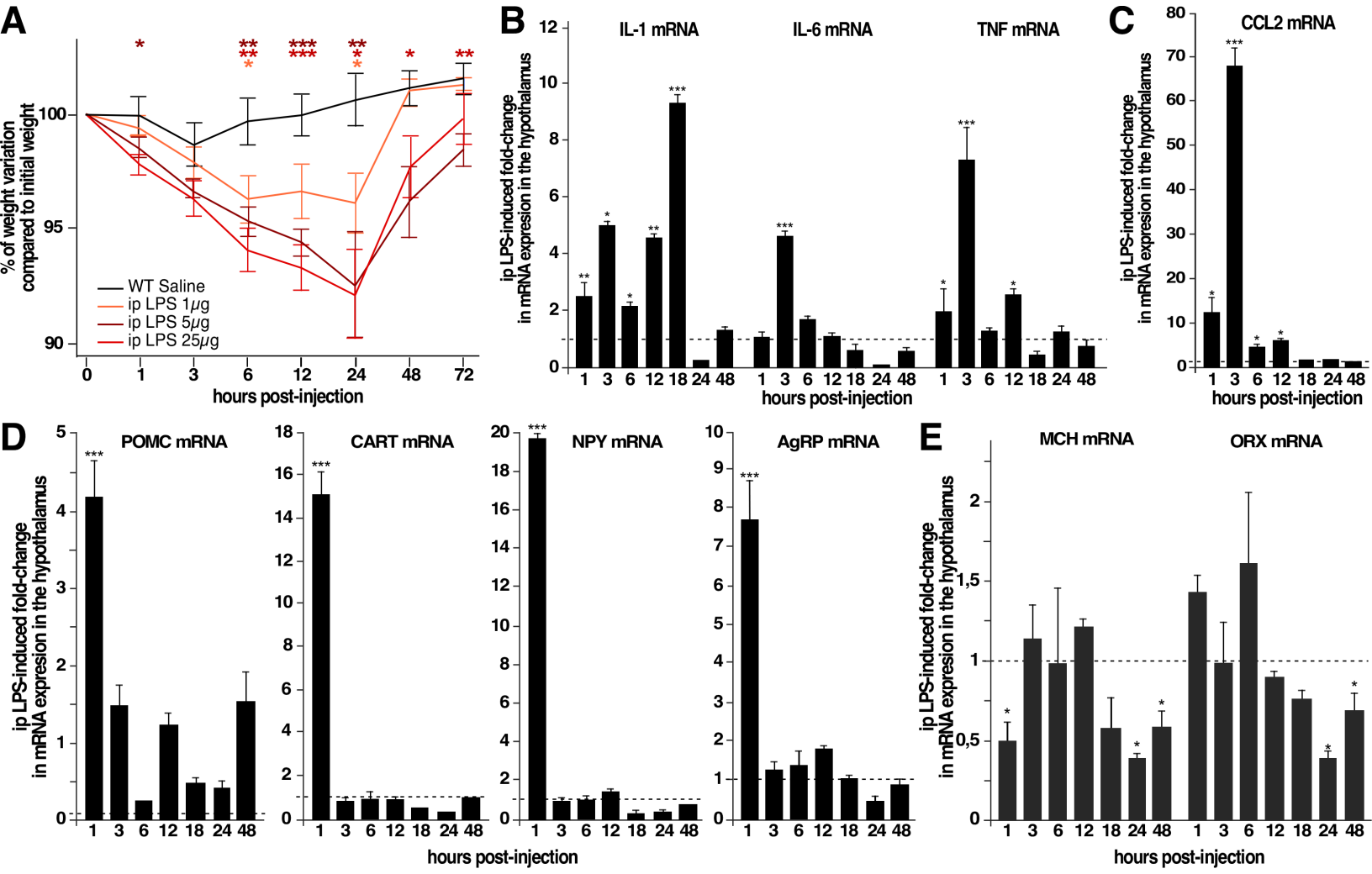
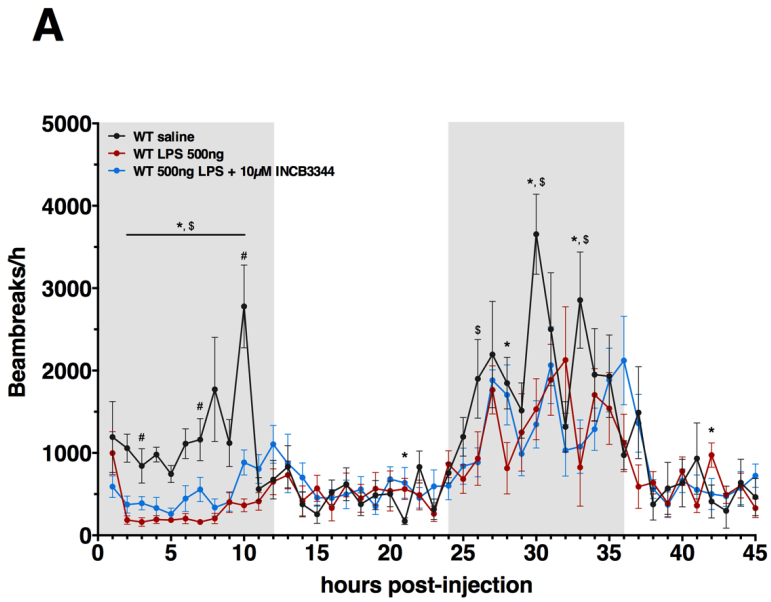
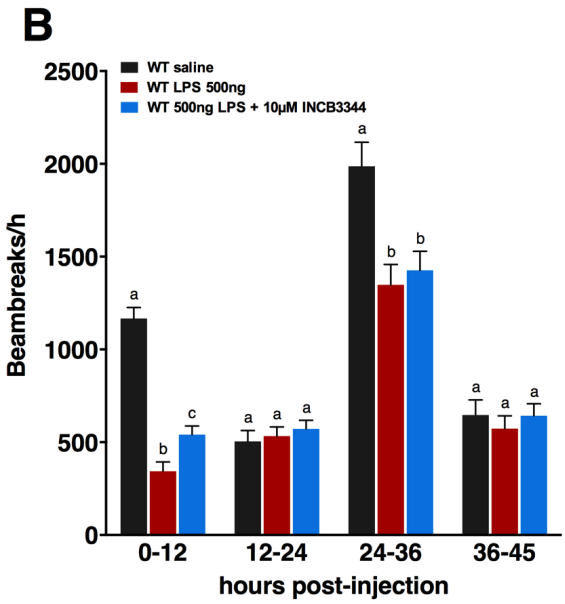

A
% of weight variation compared to initial weight
WT Saline
ip LPS 1μg
ip LPS 5μg
ip LPS 25μg
hours post-injection
B
IL-1 mRNA
IL-6 mRNA
TNF mRNA
ip LPS-induced fold-change in mRNA expresion in the hypothalamus
hours post-injection
C
CCL2 mRNA
ip LPS-induced fold-change in mRNA expresion in the hypothalamus
hours post-injection
D
POMC mRNA
CART mRNA
NPY mRNA
AgRP mRNA
ip LPS-induced fold-change in mRNA expression in the hypothalamus
hours post-injection
E
MCH mRNA
ORX mRNA
ip LPS-induced fold-change in mRNA expression in the hypothalamus
hours post-injection

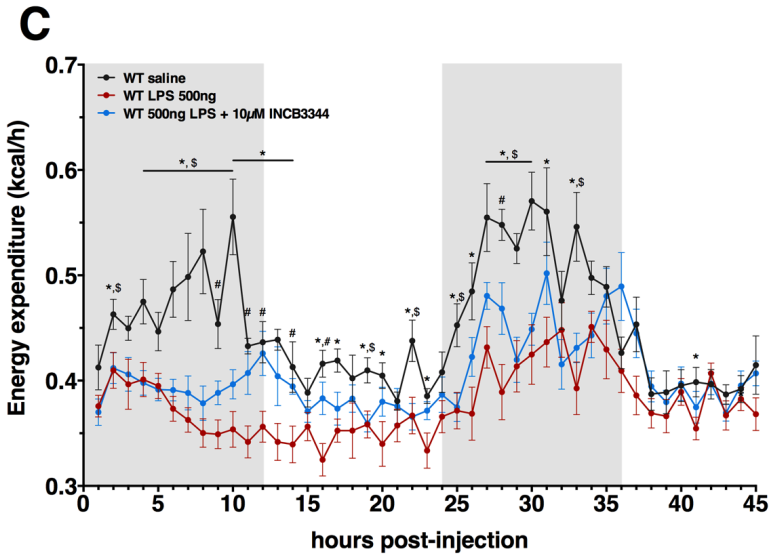
Figure EV1

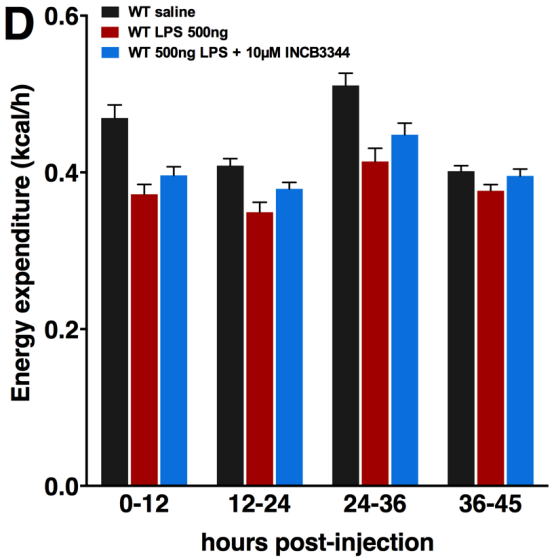
Activity



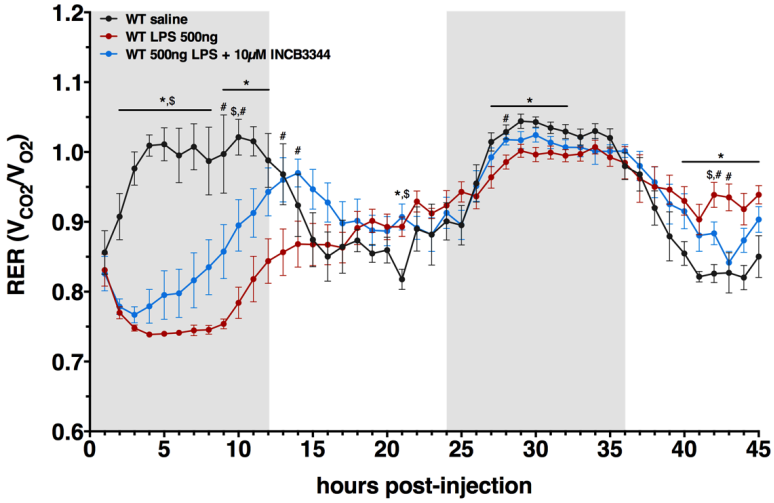


Energy expenditure





RER



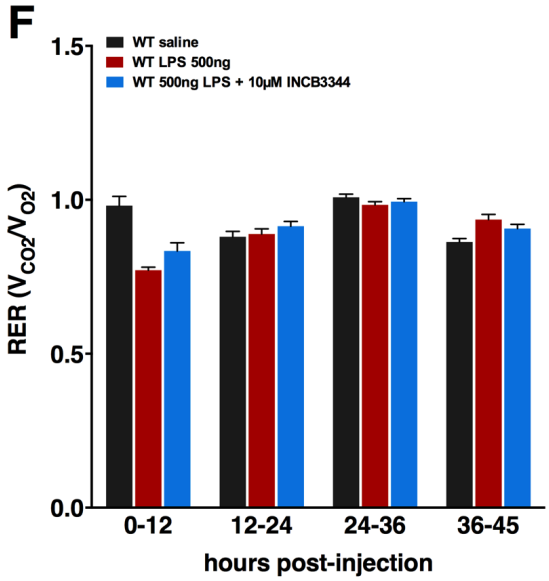


Figure EV2

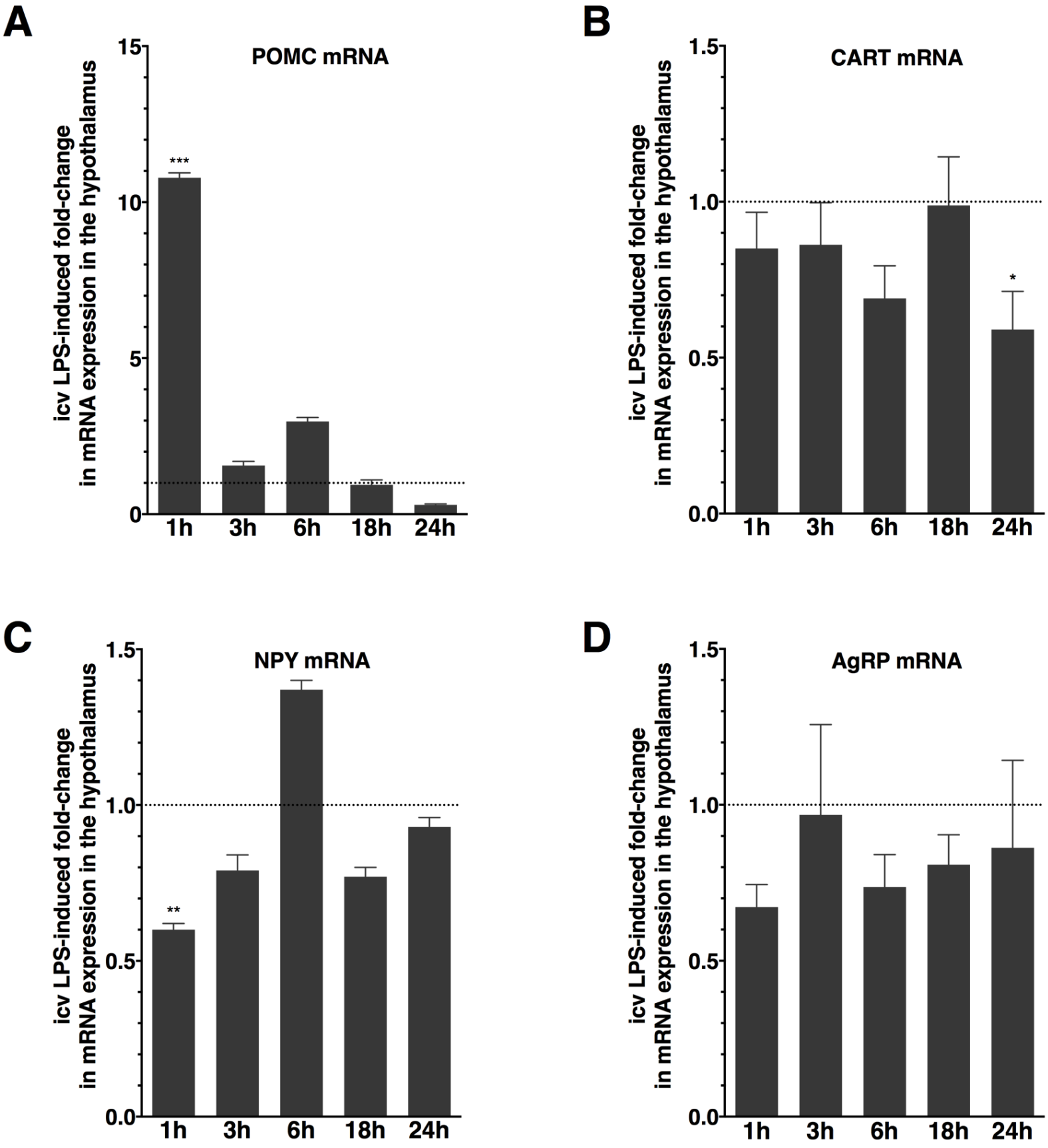

A
POMC mRNA
icv LPS-induced fold-change
in mRNA expression in the hypothalamus
15
10
5
0
***
1h
3h
6h
18h
24h
B
CART mRNA
icv LPS-induced fold-change
in mRNA expression in the hypothalamus
1.5
1.0
0.5
0.0
*
1h
3h
6h
18h
24h
C
NPY mRNA
icv LPS-induced fold-change
in mRNA expression in the hypothalamus
1.5
1.0
0.5
0.0
**
1h
3h
6h
18h
24h
D
AgRP mRNA
icv LPS-induced fold-change
in mRNA expression in the hypothalamus
1.5
1.0
0.5
0.0
1h
3h
6h
18h
24h

Figure EV3

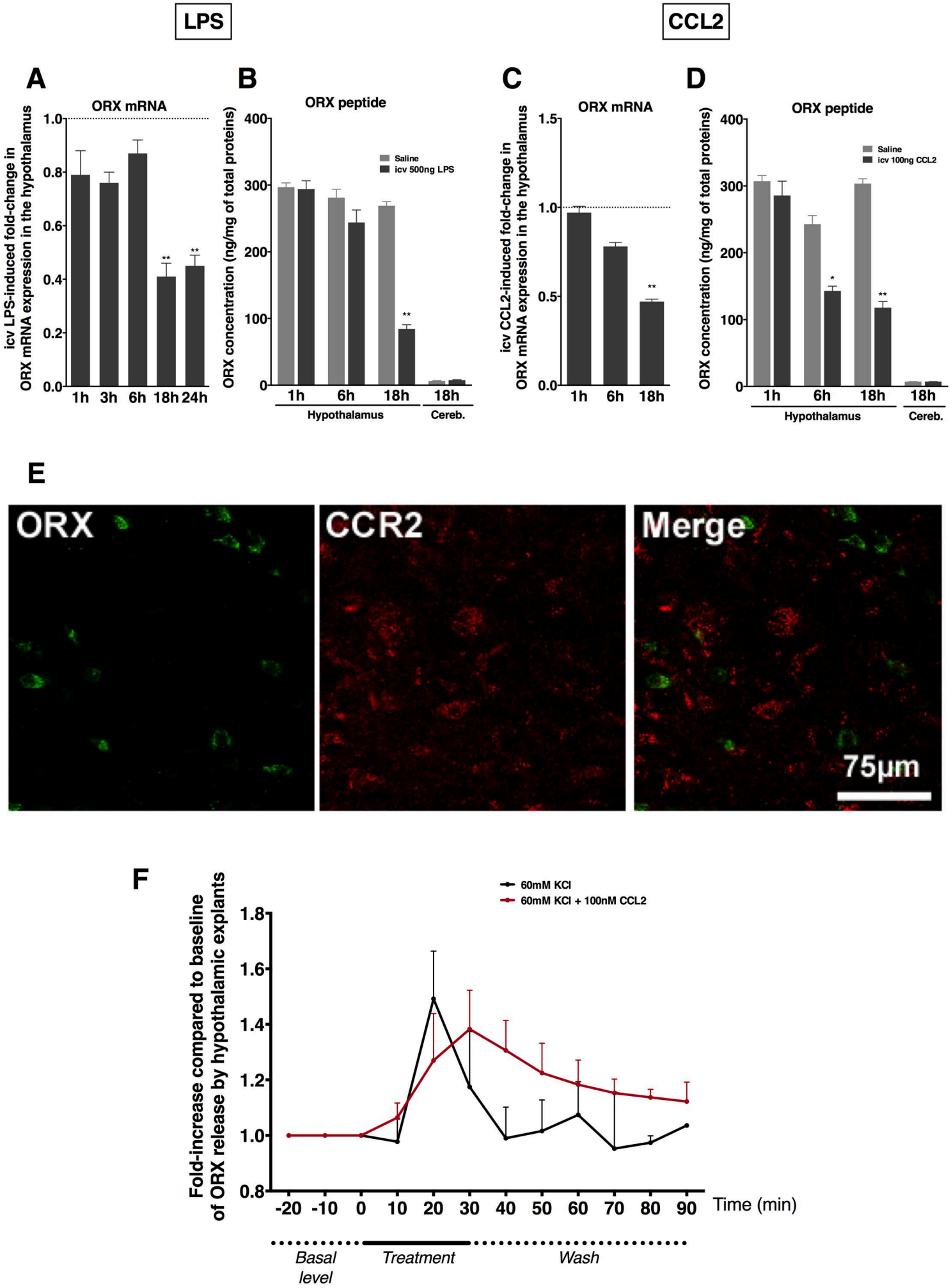

LPS
CCL2
A
ORX mRNA
icv LPS-induced fold-change in ORX mRNA expression in the hypothalamus
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1h 3h 6h 18h 24h
B
ORX peptide
ORX concentration (ng/mg of total proteins)
400
300
200
100
0
Saline
icv 500ng LPS
1h 6h 18h 18h
Hypothalamus
Cereb.
C
ORX mRNA
icv CCL2-induced fold-change in ORX mRNA expression in the hypothalamus
1.5
1.0
0.5
0.0
1h 6h 18h
D
ORX peptide
ORX concentration (ng/mg of total proteins)
Saline
icv 100ng CCL2
1h 6h 18h 18h
Hypothalamus
Cereb.
E
ORX
CCR2
Merge
75µm
F
60mM KCl
60mM KCl + 100nM CCL2
Fold-increase compared to baseline of ORX release by hypothalamic explants
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
-20 -10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90
Time (min)
Basal level
Treatment
Wash

Figure EV4

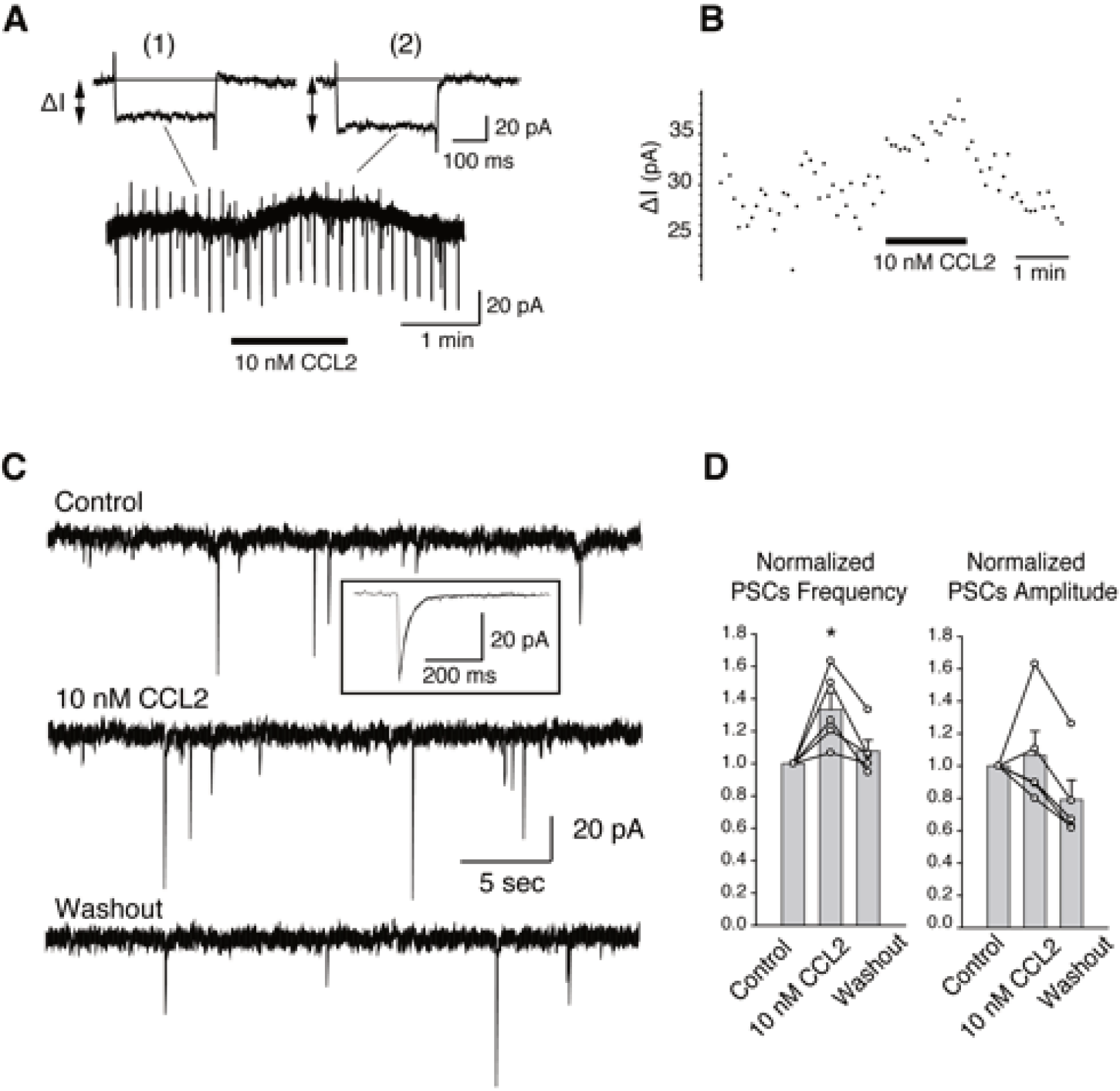

A
(1)
(2)
ΔI
20 pA
100 ms
20 pA
1 min
10 nM CCL2
B
ΔI (pA)
35
30
25
10 nM CCL2
1 min
C
Control
20 pA
200 ms
10 nM CCL2
20 pA
5 sec
Washout
D
Normalized PSCs Frequency
Normalized PSCs Amplitude
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
*
Control
10 nM CCL2
Washout

Figure EV5

Appendix Supplementary Methods

RNA isolation

Total mRNA was isolated according the method described by [62] using Fast Prep apparatus (Q-Biogene, France). 2 µg of total mRNAs were denatured at 65°C for 5min in presence of 0.5 mM dNTP and oligodT primers (25 ng/µl) (Promega, France).

RT-PCR

Except for RT^2 Profiler PCR arrays (see below) where manufacturer's protocol was followed, reverse transcription of mRNAs, was performed using SuperScript® III Reverse Transcriptase (100U; Life Technologies, France) in a total volume of 20 µl. A negative control lacking RT enzyme was also performed in each assay (NRT). RT and NRT mixtures were diluted 5 times to be used in quantitative real time PCR experiments.

Polymerase Chain Reaction Array for Cytokines and Chemokines

RT^2 Profiler Mouse Inflammatory Cytokines and Receptors PCR arrays (PAMM-011Z) (n = 6) were used to analyze the expression of a focused panel of genes. Data analysis was performed using the $\Delta\Delta C_T$ method according to the manufacturer's protocol (SABiosciences/Quiagen, France).

Quantitative Real Time PCR

Real time PCR was performed from reverse transcribed cDNA samples for relative quantitation of mRNA levels for the genes of interest. Quantitative real time PCR was performed in a LightCycler® 480 apparatus (Roche, France) using LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2X) as described by the manufacturer. Primers were designed using Primer Express 1.5 software (Applied Biosystems, USA) and are detailed in Table EV1. Real time PCR was performed for amplification of mouse IL-1β, IL-6, TNF-α, CCL2, MCH, ORX, POMC, CART, NPY, AgRP and GAPDH mRNA. In each assay, PCR were performed in duplicate. Relative quantities of target genes were determined by comparison with results for the control housekeeping gene GAPDH.

Chemokine, cytokine and neuropeptide quantification

Cerebellar and hypothalamic areas were harvested in ice-cold HBSS (Invitrogen, France) containing protease inhibitor cocktail (Roche, France). Extracts were homogenized by polytron and centrifuged. Supernatants were kept frozen until use. The protein content of the extracts was determined using the Bio-Rad protein assay reagent (Biorad Laboratories, USA). A cytometric bead array (BD™ CBA Mouse Inflammation Kit; BD Biosciences) and a mouse IL-1β ELISA Ready-SET-Go (eBiosciences, France) were used to measure protein levels of IL-6/TNF-α/CCL2 and IL-1β, respectively according the

manufacturers protocols. MCH or ORX peptide levels in tissue lysates or in perifusion samples were measured by enzyme immunoassay kits, as described by manufacturer (refs EK-070-47 and EK-003-30 respectively; Phoenix Pharmaceuticals, USA).

Whole-cell patch-clamp recordings

Whole-cell patch-clamp recording were carried out as previously described [63]. Briefly, hypothalamic slices obtained from brains of 11-28 days old MCH-CFP-KI mice were continuously superfused with a microperfusion system. For current-clamp experiments, we used a K-gluconate internal solution containing (mM): K-gluconate 135, $CaCl_2$ 0.3, $MgCl_2$ 1, HEPES 10, EGTA 1, Mg2ATP 4, Na3GTP 0.4, pH adjusted to 7.3 with KOH. Values of access resistance ranged from 12 to 20 MΩ and were left uncompensated. The liquid junction potential between the internal solution (negative) and the standard PBBS solution was 13.2 mV. Membrane potential values given in the text were not corrected for the junction potentials. Measurements were made 2-3 min after obtaining the whole-cell to ensure dialysis. MCH neurons were recognized using fluorescence as CFP in these transgenic mice is expressed under the control of MCH promoter thus only in MCH-producing neurons.

Data were digitized at 5-10 kHz using a Digidata interface coupled to a microcomputer running pClamp 9 (Axon Instruments, USA). Current-clamp data were digitized at 0.5 kHz using the same interface. Potentials were digitally filtered at 1-3 kHz. Average data are expressed as mean ± SEM, n = number of neurons.

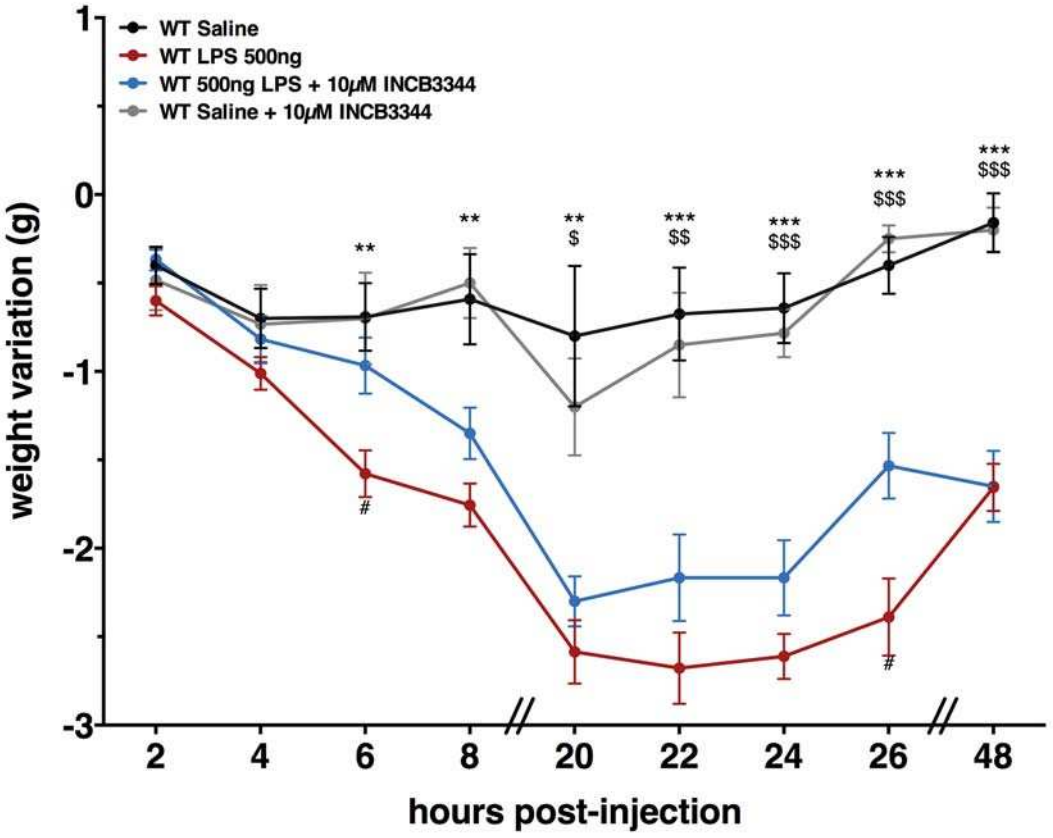

WT Saline
WT LPS 500ng
WT 500ng LPS + 10μM INCB3344
WT Saline + 10μM INCB3344
weight variation (g)
hours post-injection
1
0
-1
-2
-3
2
4
6
8
20
22
24
26
48
**
**
**
$
***
$$
***
$$$
***
$$$
***
$$$
#
#

Figure S1

Hours post-injection	WT Saline												WT LPS 500ng								
0	24,8	25	25,3	23,2	25,8	25,6	21,8	25	24,6	24,1	24,1	26,4	24,5	22,6	24,9	27,3	22,8	23,5	23,7	23	26,8
2	24,6	24,1	25,1	23,2	24,8	25,6	21,6	24,2	24,1	23,4	24	26,2	23,8	22,3	24,1	27,1	22,1	22,5	23,2	22,5	26,1
4	24,4	24,1	24,8	22,6	24,1	25	21,4	23,6	24,1	22,6	24,4	26,2	23,7	21,5	23,8	26,7	21,9	22,4	22,8	22	25,2
6	24,7	24,2	24,8	22,6	24,4	25,3	21,4	23,4	23,9	22,1	24,3	26,3	23	21,5	23,1	26	21,3	21,6	22,3	21,7	24,4
8	24,5	24	25,3	22,8	25,3	25,2	21	23	23,6	22,1	25,3	26,5	23	20,9	22,6	25,8	21,3	21,6	22,2	21,5	24,4
20		24,5		23,7		25,6	20,9	22,7		22		26,1	21,9		22,7	24,9	20,6	20,6	21,4		23,3
22	24,7	24,4	25,3	23,5	24,8	25	20,5	22,5	23,9	22,2	24,8	26	21,6	20,6	22,5	24,1	20,2	20,5	21,5	21	23
24	24,5	24,5	25,2	23,4	24,4	25	20,9	23,3	24	22,5	24,6	25,7	21,5	20,6	22,4	24,6	20,4	20,9	21	20,7	23,5
26	24,3	24,4	25,1	23,3	24,2	24,8	21,6	24,9	24,2	23,1	24,6	26,4	22,5	20,5	22,8	25,1	20,7	20,7	21,1	21,3	22,9
48	24,7	25,3	25,3	23,9	24,6	25	21,7	24,2	24,4	23,5	24,8	26,4	22,6	21,4	24	25,6	21,1	21,6	22,2	20,8	24,9

Hours post-injection	WT 500ng LPS + 10μM INCB3344						WT Saline + 10μM INCB3344					
0	25,3	22,7	24,7	21,8	24,2	23	24,9	22,4	23,1	24,7	21,9	26,4
2	24,7	22,4	24,2	21,5	23,9	22,8	24,1	21,7	23,1	24	22	25,6
4	24,4	21,7	23,5	21,2	23,3	22,7	23,6	21,4	23,1	23,7	21,8	25,4
6	23,8	21,6	23,5	21,1	23,3	22,6	23,6	21,3	23,3	23,7	21,9	25,4
8	23,5	21,5	22,9	20,7	23,2	21,8	24,2	21,2	23,1	24	22	25,9
20	22,6	20,4		19,7		20,9	23,4	20,6		24,1		25,5
22	22,8	20,6	21,8	19,6	23,1	20,8	23,3	21	23,4	23,5	21,6	25,5
24	22,8	20,8	21,7	19,7	22,7	21	23,8	21,5	22,7	24,2	21,3	25,2
26	23,6	21,5	22,4	20,4	23,2	21,4	24,8	21,9	22,8	24,5	21,5	26,4
48	23,1	21,6	22,4	20,2	22,8	21,7	24,6	22	23,4	24,4	21,6	

Table S1

Primers used for real-time PCR

Gene	sequence 5'-3'	concentration
mIL-1β-F	TGGTGTGTGACGTTCCCATT	
mIL-1β-R	CGACAGCACGAGGCTTTTTT	300 nM
mIL6-F	CCCAATTTCCAATGCTCTCC	
mIL6-R	TGAATTGGATGGTCTTGGTCC	300 nM
mTNFα-F	TGTACCAGGCTGTCGCTACA	
mTNFα-R	AGGGCAATTACAGTCACGGC	300 nM
mCCL2-F	CCAACTCTCACTGAAGCCAGC	
mCCL2-R	CAGGCCCAGAAGCATGACA	300 nM
mMCH-F	GAAGGAGAGATTTTGACATGCTCA	
mMCH-R	CCAGCAGGTATCAGACTTGCC	300 nM
mORX-F	GCCGTCTCTACGAACTGTTGC	
mORX-R	CGCTTTCCCAGAGTCAGGATA	300 nM
mPOMC-F	AGTGCCAGGACCTCACCA	
mPOMC-R	CAGCGAGAGGTCGAGTTTG	300 nM
mCART-F	CGAGAAGAAGTACGGCCAAG	
mCART-R	CTGGCCCCTTTCCTCACT	300 nM
mNPY-F	CCGCTCTGCGACACTACAT	
mNPY-R	TGTCTCAGGGCTGGATCTCT	300 nM
mAGRP-F	CCCAGAGTTCCCAGGTCTAAGTCT	
mAGRP-R	CACCTCCGCCAAAGCTTCT	300 nM
mGAPDH-F	GAACATCATCCCTGCATCC	
mGAPDH-R	CCAGTGAGCTTCCCGTTCA	300 nM

Table EV1