



**HAL**  
open science

# Étude des répercussions de l'ischémie cérébrale sur la plasticité spinale et influence de l'intensité des programmes d'entraînement sur la récupération fonctionnelle

Caroline Pin-Barre

► **To cite this version:**

Caroline Pin-Barre. Étude des répercussions de l'ischémie cérébrale sur la plasticité spinale et influence de l'intensité des programmes d'entraînement sur la récupération fonctionnelle. Médecine humaine et pathologie. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2017. Français. NNT : 2017AZUR4022 . tel-01557699

**HAL Id: tel-01557699**

**<https://theses.hal.science/tel-01557699>**

Submitted on 6 Jul 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.



École doctorale Science du Mouvement Humain ED 463 (SMH)  
Unité de recherche : Laboratoire Motricité Humaine, Éducation, Sport,  
Santé (LAMH.ESS)

# Thèse de doctorat

Présentée en vue de l'obtention du  
grade de docteur en Science du Mouvement Humain  
de  
UNIVERSITÉ NICE SOPHIA ANTIPOLIS

par

**Caroline PIN-BARRE**

Étude des répercussions de l'ischémie cérébrale sur la  
plasticité spinale et influence de l'intensité des programmes  
d'entraînement sur la récupération fonctionnelle

Dirigée par *Jeanick BRISSWALTER, Professeur, Université Côte d'Azur*  
Codirigée par *Jérôme LAURIN, Maître de Conférences, Aix-Marseille*  
*université*

Soutenue publiquement le **05 avril 2017**

Devant le jury composé de :

Jean-Yves	Salle	PU-PH, CHU-Limoges	<i>Rapporteur</i>
Anne	Tessier	PR, Université de Bourgogne	<i>Rapporteur</i>
Éric	Berton	PR, Aix-Marseille Université	<i>Examineur</i>
Nicola	Maffioletti	MCF-HDR, Schulthess Klinik, Zurich	<i>Examineur</i>
Vincent	Pialoux	PR, Université Claude Bernard, Lyon 1	<i>Examineur</i>
Raphaël	Zory	MCF-HDR, Université Côte d'Azur	<i>Examineur</i>
Jeanick	Brisswalter	PR, Université Côte d'Azur	<i>Directeur de thèse</i>
Jérôme	Laurin	MCF, Aix-Marseille Université	<i>Co-Directeur</i>

# Remerciements

J'exprime ma reconnaissance au Professeur Jeanick BRISSWALTER, mon directeur de thèse, pour m'avoir donné l'occasion de mener ce travail de thèse. Je le remercie pour ses remarques avisées et pour sa réactivité à chaque fois que je l'ai sollicité.

J'exprime tout particulièrement ma gratitude au Docteur Jérôme LAURIN, Maître de Conférence et mon co-directeur, pour son encadrement de thèse exemplaire. Merci pour ton investissement sans faille, ta disponibilité et la confiance que tu m'as donné durant toutes ses années de thèse.

Je remercie le Professeur Anne TESSIER, professeur des universités, d'avoir accepté d'expertiser mon travail de thèse en tant que rapporteur. Recevez ici ma gratitude.

Je remercie le Professeur Jean-Yves SALLE, professeur des universités et praticien hospitalier, d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail de thèse.

Merci au Professeur Vincent PIALOUX, professeur des universités, d'avoir accepté de donner de votre temps pour critiquer et juger ce travail.

Je remercie également le Docteur Nicolas MAFFIULETTI, Maître de Conférence-HDR, d'avoir accepté de donner de son temps pour examiner mon travail de thèse.

Je remercie le Docteur Raphaël ZORY, Maître de Conférence-HDR, d'avoir accepté de faire parti du jury de cette thèse et d'examiner mes travaux.

Je souhaite remercier le Professeur Éric BERTON, professeur des universités et doyen de la faculté des Sciences du Sport de Marseille, de s'être rendu disponible pour participer à mon jury de thèse.

Merci au Professeur Patrick DECHERCHI de m'avoir accueilli dans son équipe de recherche au cours de mon Master 2 et au cours de ces travaux de thèse.

Merci aux autres membres de l'équipe PSNM.

---

Je remercie le Docteur Christophe PELLEGRINO, Maître de Conférence, de m'avoir permis d'élargir mes compétences scientifiques en immunohistochimie. Merci de m'avoir permis de réaliser ces expérimentations à l'INMED. Je te remercie tout autant pour tes conseils, ta sympathie et ta disponibilité. Je remercie également Emmanuelle GOUBERT, doctorante à l'INMED, d'avoir toujours répondu présente lorsque j'ai eu besoin de ses services.

Je souhaite remercier le Docteur Franck KOBER, Chargé de Recherche au CNRS-HDR, pour la réalisation des images par résonance magnétique nécessaire à l'étude n°1 de cette thèse. Ta simplicité et ta sympathie ont rendu agréable mes visites au CRMBM.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Docteur Vincent PERTICI pour son écoute attentive, ses conseils pertinents et ses encouragements. Son implication dans le travail de recherche, sa discipline, sa créativité et sa curiosité ont été pour moi un exemple à suivre dans la réalisation de mon travail de thèse. Merci pour ta disponibilité, le partage de ton savoir-faire et pour les relectures de certains de mes documents.

Je remercie chaleureusement Annabelle CONSTANS, ma colocataire de bureau et jeune partenaire de travail, pour son sérieux, son implication et sa détermination dans la réalisation de nos études communes. Ta bonne humeur et ton soutien ont été de vraies sources de motivation.

Merci au Docteur Marie-Solenne FELIX pour son aide précieuse en histologie. Je salue également ses qualités de formatrice sans lesquelles il m'aurait été difficile d'appréhender l'utilisation du cryostat et l'art subtile du marquage au crésyl violet.

Merci à Claude FORNI, ancien ingénieur de recherche au CNRS, qui a eu la gentillesse de se déplacer à l'ISM afin de nous fournir de précieux conseils dans la manipulation des outils en électrophysiologie animale.

Merci à Thelma COYLE, ingénieur, d'avoir contribué à l'élaboration du programme Matlab nécessaire pour l'analyse des mesures faites avec le DWB.

Merci à Patrick SAINTON, ingénieur, pour sa disponibilité et ses conseils sur le réglage de l'analyse vidéo utilisée dans les études de cette thèse.

Merci à l'ensemble des personnes du service technique, et plus particulièrement à Alain et Ludo qui ont contribué à réaliser toutes nos demandes nécessaires au bon déroulement de nos études.

Je remercie vivement Jean-Pierre GRIMALDI, Chevalier des palmes académiques, pour m'avoir acceptée au sein de son « équipe » !! Je suis toujours aussi contente de t'avoir connue.

Un grand Merci à Annabelle, Vincent, Maxime, Guillaume, Marie-Solenne, Jérôme, Jean-Pierre et Mathieu pour avoir rendu mes années de thèse agréables. Un merci particulier à Mathieu pour son amitié qui m'a accompagnée pendant toute la durée de mes études et durant lesquelles nous avons partagé nos joies et nos galères. Je salue également Fabien, Manue, Sophie et Anne-So que je remercie pour les bons moments passés autour de repas gourmands.

Au terme de ce parcours, je souhaite exprimer ma gratitude à mes parents, ma sœur Clémence et mon cousin Nico pour leurs encouragements qu'ils m'ont apporté sans une once de pression durant toutes ces années d'études. Merci pour leur confiance et leur soutien inconditionnel.

Je remercie enfin toutes les personnes qui me sont proches, Coralie, Inès, Phil que j'ai parfois délaissés ces derniers mois pour achever cette thèse. Malgré cela, leur enthousiasme pour m'aider à décompresser entre deux manips' n'a jamais faibli. Merci à eux pour ça et pour leur soutien moral. Je n'oublie pas Julien et sa bande qui m'apportent toujours de beaux fous rires, souvent nécessaires au cours d'une thèse.

# Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

## Publications acceptées dans des revues indexées dans le *Journal Citation Report (JCR)* :

- A new method to assess weight-bearing distribution after central nervous system lesions in rats. *Behavioral Brain Research*. 259, 78–84. doi:10.1016/j.bbr.2013.10.043. (2014).

\***PIN-BARRE, C.**, \*PERTICI, V., FELIX, M.-S., LAURIN, J., BRISSWALTER, J., DERCHERCHI, P. \*Vincent Pertici et Caroline Pin-Barre sont considérés comme 2 premiers auteurs de l'article. Ils ont contribué de manière similaire pour cette étude. [Impact factor (IF) 2014 : 3,417].

- Acute Neuromuscular Adaptation at the Spinal Level Following Middle Cerebral Artery Occlusion-Reperfusion in the Rat. *PLoS ONE*. 9, e89953. doi:10.1371/journal.pone.0089953. (2014).

**PIN-BARRE, C.**, LAURIN, J., FELIX, M.-S., PERTICI, V., MARQUESTE, T., KOBER, F., MATARAZZO, V., MUSCATELLI-BOSSY, F., TEMPREADO, J.-J., BRISSWALTER, J., DERCHERCHI, P. (IF 2014 : 3,73).

- Physical Exercise as a Diagnostic, Rehabilitation, and Preventive Tool: Influence on Neuroplasticity and Motor Recovery after Stroke. *Neural Plasticity*. 2015, 1–12. doi:10.1155/2015/608581. (2015).

**PIN-BARRE, C** & LAURIN, J. (IF 2015 : 3,582).

- Functional and Neuromuscular Changes after Anterior Cruciate Ligament Rupture in Rats. *Medecine Science Sports Exercise*. 48, 1033–1043. doi:10.1249/MSS.0000000000000860. (2015).

LAURIN, J., **PIN-BARRE, C.**, BERNARD, G., DOUSSET, E., DERCHERCHI, P. (IF 2015 : 3,983).

- Influence of Aerobic Training and Combinations of Interventions on Cognition and Neuroplasticity after Stroke. *Front. Aging Neurosci*. 8. doi:10.3389/fnagi.2016.00164. (2016).

\***PIN-BARRE, C.**, \*CONSTANS A., LAURIN, J., TEMPREADO, J.-J., DERCHERCHI, P. (IF 2016 : 4,348). \*Annabelle Constans et Caroline Pin-Barre sont considérés comme 2 premiers auteurs de l'article. Elles ont contribué de manière similaire pour cette étude.

**Publication acceptée dans des revues non-indexées dans le JCR :**

- Physiological Adaptations Following Endurance Exercises after Stroke: Focus on the Plausible Role of High-Intensity Interval Training. *International Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. s3. doi:10.4172/2329-9096.S3-006. (2014).

**PIN-BARRE, C & LAURIN, J.**

**Communication dans des congrès nationaux**

- Répercussions d'une ischémie cérébrale sur l'activité des afférences musculaire métabosensibles chez le rat.

**PIN-BARRE, C., LAURIN, J., DERCHERCHI, P., BRISSWALTER, J.**

*Communication affichée au 11<sup>ème</sup> congrès de l'école doctorale « Sciences du Mouvement Humain », Montpellier, France, 25 mai 2015.*

# Abréviations

<b>5-HT</b>	<i>5-hydroxytryptamine</i>
<b>AC</b>	Anticorps
<b>ACC</b>	Artère carotide commune
<b>ACE</b>	Artère carotide externe
<b>ACI</b>	Artère carotide interne
<b>ACM</b>	Artère cérébrale moyenne
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AL</b>	Acide lactique
<b>AMPA</b>	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
<b>ANOVA</b>	Analyse de la variance
<b>AO</b>	Artère occipitale
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ASICs</b>	<i>Acid Sensing Ion Channels</i>
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate
<b>ATS</b>	Artère thyroïde supérieure
<b>AVC</b>	Accident vasculaire cérébral
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>BDNF</b>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
<b>BSA</b>	Albumine de sérum bovin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>CCCs</b>	<i>Cation-Chloride Co-transporters</i>
<b>Cl</b>	Chlore
<b>CMEPs</b>	Potentiels moteurs évoqués cervico-médullaire
<b>CNRS</b>	Centre national de la recherche scientifique
<b>CV</b>	Crésyl violet
<b>DAMPs</b>	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
<b>DRG</b>	<i>Dorsal root ganglion</i>
<b>DSCr</b>	Débit sanguin cérébral régional
<b>DWB</b>	<i>Dynamic weight-bearing</i>
<b>EIF</b>	Fatigue musculaire induite électriquement
<b>EMG</b>	Électromyographie
<b>eNOS</b>	oxyde nitrique synthase endothéliale
<b>EPCs</b>	<i>Endothéliale Progenitor Cells</i>
<b>ET-1</b>	Endothéline-1
<b>FC réserve</b>	Fréquence cardiaque de réserve
<b>GABA</b>	<i>γ-Aminobutyric acid</i>
<b>GABA<sub>A</sub></b>	Récepteur ionotropique du GABA
<b>GAPDH</b>	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
<b>GDNF</b>	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
<b>GFAP</b>	Protéine acide fibrillaire gliale
<b>H<sup>+</sup></b>	Proton
<b>HAS</b>	Haute Autorité de Santé
<b>HIT</b>	Exercice aérobie intermittent de haute intensité ou <i>high interval training</i>
<b>Iba-1</b>	<i>Ionized calcium binding adaptator molecule 1</i>
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>IFN-γ</b>	<i>Interferon-γ</i>

<b>IL</b>	<i>Interleukin</i>
<b>K<sup>+</sup></b>	Potassium
<b>KCC2</b>	<i>Potassium-chloride transporter member 5</i>
<b>KCl</b>	Chlorure de potassium
<b>MCAo-r</b>	<i>Middle cerebral artery occlusion-reperfusion</i>
<b>MMPs</b>	Métalloprotéases matricielles
<b>MOD</b>	Exercice aérobie d'intensité modérée
<b>MyD88</b>	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodium
<b>NKCC1</b>	<i>Na-K-Cl co-transporter</i>
<b>NF-κB</b>	<i>Nuclear factor-kappa B</i>
<b>NGF</b>	<i>Nerve growth factor</i>
<b>NMDA</b>	<i>N-Méthyl-D-aspartic acid</i>
<b>NO</b>	Monoxyde d'azote ou oxyde nitrique
<b>NT</b>	Neurotrophine
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>P2X</b>	Récepteurs purinergique ionotropique
<b>p75<sup>NTR</sup></b>	Récepteur p75 des facteurs neurotrophiques
<b>PBS</b>	<i>Tampon phosphate salin</i>
<b>PECAM-1</b>	<i>Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldéhyde
<b>PGC-1α</b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α</i>
<b>pH</b>	Potentiel hydrogène
<b>PME</b>	Potentiel moteur évoqué
<b>PGE2</b>	Prostaglandines de type E2
<b>PPADS</b>	<i>Pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt hydrate</i>
<b>PRRs</b>	<i>Pattern recognition receptors</i>
<b>Réflexe-H</b>	Réflexe d'Hoffmann
<b>ROS</b>	Dérivés réactifs de l'oxygène
<b>SDS-PAGE</b>	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
<b>SL</b>	Seuil lactique
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SNP</b>	Système nerveux périphérique
<b>STT</b>	Voie spino-thalamique
<b>SV1</b>	Seuil ventilatoire 1
<b>SWB</b>	<i>Static weight-bearing</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered saline</i>
<b>TBS-T</b>	<i>Tris-buffered saline avec du Tween</i>
<b>TGF-β</b>	<i>Transforming growth factor-β</i>
<b>TIMPs</b>	Protéines inhibitrices des métalloprotéases
<b>TLRs</b>	<i>Toll-like receptors</i>
<b>TM-6</b>	Test de marche de 6 min
<b>TM-10</b>	Test de marche de 10 mètres
<b>TNF-α</b>	<i>Tumor necrosis factor- α</i>
<b>Trks</b>	Récepteurs tyrosine kinase
<b>TRP</b>	<i>Transient Receptor Potential Channels</i>
<b>TTC</b>	Chlorure de triphenyltetrazolium
<b>VB</b>	Noyau ventrobasal du thalamus
<b>VEGF</b>	<i>Vascular endothelial growth factor</i>



<b>VEGFR</b>	Récepteur du VEGF
<b>V<sub>max</sub></b>	Vitesse maximale atteinte
<b>VO<sub>2</sub></b>	Consommation d'oxygène
<b>VO<sub>2pic</sub></b>	Consommation pic d'oxygène atteinte
<b>VO<sub>2max</sub></b>	Consommation maximale d'oxygène
<b>VPL</b>	Noyau ventro-postéro-latéral du thalamus
<b>VPM</b>	Noyau ventro-postéro-médial du thalamus
<b>VPN</b>	Noyau ventropostérieur du thalamus
<b>V<sub>SL</sub></b>	Vitesse au seuil lactique

# Table des matières

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I</b> .....	<b>9</b>
1. Les principaux déficits associés à l'AVC .....	10
1.1 <i>Les déficits sensorimoteurs</i> .....	10
1.2 <i>Les déficits cardiorespiratoires</i> .....	13
1.3 <i>Les déficits cognitifs</i> .....	15
2. L'ischémie cérébrale : une physiopathologie complexe et évolutive .....	16
2.1 <i>La chute du débit sanguin cérébral : caractérisation des zones ischémiques</i> .....	18
2.1.1 Le Core : Cœur de l'ischémie.....	19
2.1.2 La <i>penumbra</i> ischémique .....	20
2.2. <i>Défaillance bioénergétique cellulaire et dérégulation de l'homéostasie ionique</i> .....	21
2.3 <i>Excitotoxicité et diffusion des ondes de dépolarisation dans la penumbra</i> .....	22
2.4 <i>Le stress oxydant et la dégradation cellulaire : altération de la barrière hémato-encéphalique</i> .....	23
2.5 <i>La réponse inflammatoire post-ischémique contribue aux dommages cérébraux</i> .....	25
2.6 <i>Les effets délétères de la reperfusion sanguine</i> .....	27
2.7 <i>Évolution de la cascade ischémique dans le temps</i> .....	27
2.8 <i>Le modèle animal dans la recherche sur l'AVC</i> .....	28
3. Évaluation des déficits suite à une ischémie cérébrale chez le rat .....	31
3.1 <i>Mesures comportementales</i> .....	31
3.1.1 <i>Altérations sensorimotrices chez le rat</i> .....	31
3.1.2 <i>Controverses sur les atteintes sensorimotrices</i> .....	33
3.2 <i>Analyse histologique : le volume lésionnel</i> .....	34
4. Réorganisation du système nerveux central après une ischémie cérébrale .....	36
4.1 <i>Concept de neuroplasticité</i> .....	36
4.2 <i>Plasticité cérébrale et spinale post-AVC</i> .....	37
4.2.1 <i>Le réflexe de Hoffman : un outil d'exploration de la plasticité neuromusculaire au niveau spinal</i> .....	42
4.2.2 <i>Perturbation de la régulation des réflexes somatiques post-AVC</i> .....	45
4.2.3 <i>Le rôle de la fatigue induite par l'exercice physique dans la régulation de l'activité réflexe : Effet de l'ischémie cérébrale ?</i> .....	49
5. Étude n°1 .....	53
5.1 <i>Objectif de l'étude n°1</i> .....	53
5.2 <i>Matériels &amp; méthodes de l'étude n°1</i> .....	54
5.2.1 <i>Animaux</i> .....	54

5.2.2	Protocole expérimental .....	54
5.2.3	Induction d'une ischémie cérébrale : Présentation du modèle de la « middle cerebral artery occlusion reperfusion » - la MCAo-r .....	56
5.2.4	Analyse comportementale : évaluation de la récupération fonctionnelle .....	59
5.2.5	Mesures électrophysiologiques.....	66
5.2.6	Analyse histologique : évaluation de la taille de la lésion cérébrale .....	69
5.2.7	Imagerie par résonance magnétique (IRM) : évaluation de l'œdème cérébral.....	71
5.2.8	Analyses statistiques.....	73
5.3	Résultats de l'étude n°1 .....	74
5.3.1	Analyse comportementale : évaluation de la récupération fonctionnelle.....	74
5.3.2	Mesures électrophysiologiques.....	84
5.3.3	Analyse histologique : taille de la lésion cérébrale .....	88
5.3.4	IRM : étendu de l'œdème cérébral .....	89
5.4	Discussion de l'étude n°1 .....	90
5.5	Conclusion de l'étude n°1 et perspectives.....	100
<b>Chapitre II</b>	.....	<b>107</b>
1.	Propriétés des afférences musculaires des groupes III et IV .....	108
1.1	Généralités sur les afférences musculaires des groupes III et IV.....	108
1.2	Origines anatomiques des afférences musculaires des groupes III et IV .....	109
1.2.1	Terminaisons nerveuses libres du muscle squelettique .....	109
1.2.2	Les récepteurs moléculaires.....	113
1.3	Les activateurs des afférences musculaires des groupes III et IV .....	116
1.3.1	Réponse des afférences des groupes III et IV aux stimuli mécaniques.....	117
1.3.2	Réponse des afférences des groupes III et IV aux stimuli chimiques .....	118
1.3.3	Sensibilisation des afférences des groupes III et IV à leurs différents stimuli.....	120
2.	Régulation des fonctions neuromusculaires par les afférences des groupes III et IV.....	123
2.1	Projections spinales des fibres afférentes fines .....	123
2.2	Rôle des afférences des groupes III et IV : Études sur le modèle animal.....	124
2.2.1	Influence des afférences des groupes III et IV sur le muscle homonyme .....	124
2.2.2	Influence des afférences des groupes III et IV sur le muscle hétéronyme .....	127
2.3	Rôle des afférences des groupes III et IV : Études chez le sujet sain .....	127
2.4	Projections supraspinales des informations en provenance des fibres afférentes fines .....	129
2.5	Le thalamus ventropostérieur : une zone d'intégration possible des informations sensitives musculaires .....	130
2.6	Conséquences d'une ischémie cérébrale au niveau de l'ACM sur le thalamus .....	131

3. Étude n°2.....	136
3.1 <i>Objectif de l'étude n°2</i> .....	136
3.2 <i>Matériels &amp; méthodes de l'étude n°2</i> .....	136
3.2.1 Animaux .....	136
3.2.2 Protocole expérimental .....	137
3.2.3 Induction d'une ischémie cérébrale par la MCAo-r .....	138
3.2.4 Analyse comportementale : évaluation de la récupération fonctionnelle.....	139
3.2.5 Mesures électrophysiologiques.....	141
3.2.6 Analyses histologiques : évaluation de la taille de la lésion cérébrale et vérification de l'emplacement des électrodes dans le thalamus .....	154
3.2.7 Analyses Statistiques .....	155
3.3 <i>Résultats de l'étude n°2</i> .....	156
3.3.1 Analyse comportementale : évaluation de la récupération fonctionnelle.....	156
3.3.2 Mesures électrophysiologiques.....	163
3.3.3 Analyses histologiques : évaluation de la taille de la lésion et vérification de l'emplacement des électrodes dans le thalamus .....	173
3.4 <i>Discussion de l'étude n°2</i> .....	176
3.5 <i>Conclusion de l'axe 1 et perspectives</i> .....	182
<b>Chapitre III .....</b>	<b>190</b>
1. Influence de l'ischémie cérébrale sur l'activité microgliale, les facteurs neurotrophiques et l'activité GABAergique .....	193
1.1 <i>Le rôle de la microglie dans l'inflammation et la neuroplasticité post-ischémique</i> .....	193
1.2 <i>Le rôle des facteurs neurotrophiques dans la neuroplasticité post-ischémie cérébrale</i> ....	200
1.2.1 Les neurotrophines et leurs récepteurs .....	200
1.2.2 Réparation vasculaire et angiogenèse.....	203
1.3 <i>Homéostasie du Cl- et action du GABA post-ischémique</i> .....	204
2. Influence de l'entraînement en endurance sur la récupération fonctionnelle et la neuroplasticité après une ischémie cérébrale.....	210
2.1 <i>Intérêt de l'entraînement en endurance post-AVC</i> .....	210
2.1.1 Déclin de l'aptitude aérobie post-AVC .....	210
2.1.2 Recommandations actuelles pour les entraînements en endurance suite à un AVC ...	213
2.2 <i>Effets sur les adaptations cardiovasculaires et métaboliques chez le patient AVC</i> .....	215
2.3 <i>Effets sur la neuroinflammation et la neuroplasticité post-ischémique chez le rongeur</i> ....	217
3. Le rôle potentiel de l'intensité d'exercice dans la rééducation post-AVC .....	224
3.1 <i>Facteurs d'optimisation de l'entraînement en endurance ?</i> .....	224

3.2 « <i>High-intensity Interval Training</i> » : caractéristiques d'un exercice d'endurance de haute intensité .....	226
3.3 <i>Influence des HIT sur les adaptations physiologiques</i> .....	228
3.3.1 Adaptations physiologiques majeures chez le sujet sain .....	228
3.3.2 Effets bénéfiques controversés des HIT post-ischémie cérébrale .....	230
4. Considérations méthodologiques des programmes d'endurance .....	235
4.1 <i>Harmonisation de la charge de travail entre les groupes d'étude</i> .....	236
4.2 <i>Évaluation de l'aptitude aérobie : Limites de l'utilisation des paramètres maximaux comme VO<sub>2</sub>pic, FCmax et la vitesse maximale atteinte (Vmax)</i> .....	236
4.3 <i>Intérêt des paramètres physiologiques sous-maximaux pour évaluer l'aptitude aérobie et déterminer les intensités d'exercice</i> .....	240
5. Étude n°3.....	244
5.1 <i>Objectif de l'étude n°3</i> .....	244
5.2 <i>Matériels &amp; méthodes de l'étude n°3</i> .....	244
5.2.1 Animaux .....	244
5.2.2 Protocole expérimental .....	245
5.2.3 Induction d'une ischémie cérébrale par la MCAo-r .....	246
5.2.4 Analyse comportementale : évaluation de la récupération fonctionnelle.....	247
5.2.5 Évaluation de l'aptitude aérobie .....	247
5.2.6 Analyses immunohistologiques : évaluation des marqueurs de la neuroplasticité et de la taille de la lésion .....	251
5.2.7 Analyses statistiques.....	258
5.3 <i>Résultats de l'étude n°3</i> .....	259
5.3.1 Caractéristiques des séances de rééducation .....	259
5.3.2 Analyse comportementale : évaluation de la récupération fonctionnelle.....	260
5.3.3 Évaluation de l'aptitude aérobie .....	265
5.3.4 Analyses immunohistologiques : évaluation des marqueurs de la neuroplasticité et de la taille de la lésion .....	270
5.4 <i>Discussion de l'étude n°3</i> .....	277
5.5 <i>Conclusion de l'étude n°3 et perspectives</i> .....	288
<b>Conclusion générale et perspective .....</b>	<b>300</b>
<b>Annexe 1.....</b>	<b>305</b>
<b>Annexe 2 .....</b>	<b>306</b>
<b>Annexe 3 .....</b>	<b>307</b>

# Table des illustrations

## Chapitre I

**Figure 1.1:** Perturbation de la commande motrice volontaire après une lésion du cortex cérébral. **p.12**

**Figure 1.2:** Exemple de coupe transversale du muscle vaste latéral (VL) de la jambe parétique et non parétique d'un patient AVC chronique marquées avec de l'adénosine triphosphate. **p.13**

**Figure 1.3:** Tomodensitométrie bilatérale des muscles de la cuisse chez des patients AVC chroniques. **p.14**

**Figure 1.4:** Comparaison entre le  $VO_{2pic}$  de sujets hémiparétiques chroniques et d'individus sains du même âge sédentaires. **p.15**

**Figure 1.5:** Représentation schématique des différents mécanismes impliqués dans la cascade ischémique conduisant à la mort cellulaire après une ischémie cérébrale. **p.17**

**Figure 1.6:** Évolution spatiale et temporelle d'une ischémie cérébrale aiguë. **p.19**

**Figure 1.7:** Les différences majeures entre le processus de nécrose et le processus d'apoptose. **p.21**

**Figure 1.8:** Évolution spatio-temporelle de la cascade ischémique. **p.28**

**Encadré 1.1:** Le modèle animal et l'ischémie cérébrale: quelle espèce choisir? **p.29**

**Encadré 1.2:** Les différents modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale. **p.30**

**Figure 1.9:** Exemple d'une coupe de cerveau de rat marqué au TTC (A) et au CV (B) après une ischémie cérébrale. **p.35**

**Figure 1.10:** Mécanismes spécifiques à la récupération spontanée après l'ischémie cérébrale et impliquée dans la récupération fonctionnelle. **p.38**

**Figure 1.11:** Réorganisation neuroanatomique après lésion corticale chez le rat. **p.40**

**Encadré 1.3:** La moelle épinière : un centre d'intégration sensorimoteur. **p.41**

**Figure 1.12:** Mécanisme du réflexe-H. **p.42**

**Encadré 1.4:** Les mécanismes de régulation du réflexe-H. **p.44**

**Figure 1.13:** Exemple de réponses du réflexe-H en fonction de différents pourcentages de support du poids corporel sur le triceps surae et de différentes. **p.47**

**Figure 1.14:** Monofilament utilisé. **p.56**

**Figure 1.15:** Étapes majeures de la méthode MCAo-r. **p.58**

**Figure 1.16:** Quatre des 6 tests comportementaux utilisés dans l'étude n°1. **p.59**

**Figure 1.17:** Signes neurologiques consécutifs à l'ischémie cérébrale. **p.60**

**Figure 1.18:** Les différentes positions de la patte antérieure gauche pouvant être obtenues au cours de la montée de l'échelle. **p.62**

**Figure 1.19:** Dispositif spécifique au test de la distribution pondérale (DWB). **p.65**

**Figure 1.20:** Dispositif expérimental pour les enregistrements électrophysiologiques de l'étude n°1. **p.68**

**Figure 1.21:** Dispositif expérimental pour la perfusion intracardiaque. **p.70**

**Figure 1.22:** Dispositif IRM pour rongeur. **p.71**

**Tableau 1.1:** Résultats des tests comportementaux des groupes Témoins, SHAM-J1 et MCAo-J1. **p.74**

**Tableau 1.2:** Score neurologique des différents groupes d'animaux sur 1 semaine. **p.75**

**Figure 1.23:** Test de suspension par la queue. **p.76**

**Figure 1.24:** Test de l'équilibre statique. **p.77**

**Figure 1.25:** Test de l'échelle inclinée. **p.78**

**Figure 1.26:** Force de préhension exprimée en grammes (g) produite avec les 2 pattes simultanément. **p.79**

**Figure 1.27:** Rapport de force patte gauche sur patte droite. **p.80**

**Figure 1.28:** Force de préhension produite par A) la patte gauche et B) la patte droite. **p.81**

**Figure 1.29:** Test de distribution pondérale: répartition des appuis en fonction du temps passé sur 4 pattes. **p.82**

**Figure 1.30:** Durée de l'exercice isométrique induit par une stimulation électrique au niveau du nerf musculospiral. **p.83**

**Figure 1.31:** Exemple de l'évolution d'une force au cours d'un exercice isométrique induit électriquement chez un rat SHAM, MCAo-J1 et MCAo-J7. **p.84**

**Figure 1.32:** Modification du rapport  $H_{\max}/M_{\max}$  après l'exercice isométrique. **p.85**

**Figure 1.33:** Exemple de réflexe-H observés avant et après la fatigue induite électriquement chez un rat SHAM et un rat MCAo-J1. **p.86**

**Tableau 1.3:** Quantification de la zone infarctée au Crésyl violet. **p.87**

**Figure 1.34:** Coupes marquées au Crésyl Violet suite à l'ischémie induite par la MCAo-r. **p.87**

**Tableau 1.4:** Analyse IRM ( $T_2$ ). **p.88**

**Figure 1.35:** Imagerie par résonance magnétique suite à une ischémie cérébrale par la méthode MCAo-r. **p.88**

## **Chapitre II**

**Figure 2.1:** Représentation schématique des terminaisons nerveuses libres des afférences myélinisées et non-myélinisées avec leurs varicosités dans les muscles soleus-gastrocnemius du chat. **p.110**

**Figure 2.2:** Reconstruction d'une série complète de sections sur une longueur totale de 1 mm illustrant 3 différentes terminaisons d'afférences du groupe III au niveau du tendon. **p.112**

**Figure 2.3:** Interaction des P2X et des ASICs après application d'ATP. **p.115**

**Figure 2.4:** Exemple de la distribution des différents types de récepteurs parmi les afférences des groupes III et IV dans les muscles soleus-gastrocnemius chez le chat. **p.117**

**Encadré 2.1:** Projections des afférences musculaires des groupes III et IV sur les couches de Rexed. **p.124**

**Figure 2.5:** Modifications de l'amplitude du réflexe monosynaptique au niveau du muscle gastrocnemius-soleus chez le chat avant et après contraction fatigante. **p.125**

**Encadré 2.2:** Le thalamus dorsal et ventral. **p.131**

**Figure 2.6:** Exemple de microscopie électronique de cellules suite à une ischémie du cortex. **p.133**

**Figure 2.7:** Dispositif expérimental pour le test du Von Frey électronique. **p.140**

**Figure 2.8:** Le test du ruban adhésif. **p.141**

**Figure 2.9:** Disposition du cathéter artériel pour l'injection de métabolites dans le triceps *brachii*. **p.143**

**Figure 2.10:** Distribution des motoneurones innervant le triceps *brachii* au niveau de la corne dorsale cervical de la moelle épinière chez le rat. **p.144**

**Figure 2.11:** Illustration de la première étape de la chirurgie où les ganglions dorsaux et la racine dorsale sont exposés. **p.145**

**Figure 2.12:** Procédure expérimentale en électrophysiologie pour la mesure du réflexe somatique suite à l'activation des afférences musculaires des groupes III et IV *via* l'injection de métabolites. **p.147**

**Figure 2.13:** Positionnement des électrodes de stimulation ou d'enregistrement sur la racine dorsale C7 controlatérale à l'ischémie cérébrale. **p.148**

**Figure 2.14:** Procédure expérimentale en électrophysiologie pour l'enregistrement de la fréquence de décharges des afférences musculaires des groupes III et IV (1) et de l'activité des VPL ipsi- et controlatéral du thalamus (2) en réponse à l'injection de métabolites. **p.149**

**Figure 2.15:** Les os du crâne du rat servant de repère pour la stéréotaxie (vue dorsale). **p.151**

**Figure 2.16:** Coupe coronale de cerveau selon la figure 52 de l'Atlas de Paxinos & Watson (2006). **p.152**

**Figure 2.17:** Seuil de sensibilité mécanique à la pression mesuré à partir du Von Frey électronique de la patte antérieure gauche. **p.156**

**Figure 2.18:** Ratio PAG/PAD du seuil de sensibilité mécanique à la pression. **p.158**

**Figure 2.19:** Temps de détection de la pastille par la patte antérieure gauche (A) et par la patte antérieure droite (B). **p.160**

**Figure 2.20:** Temps pour retirer la pastille sur la patte antérieure gauche (A) et par la patte antérieure droite (B). **p.161**

**Figure 2.21:** Modification de la réponse des afférences métabosensibles suite à l'injection de différentes combinaisons de métabolites. **p.164**

**Figure 2.22:** Modification de la réponse des afférences métabosensibles POST-PPADS après injections de métabolites. **p.165**

**Figure 2.23:** Modification de la réponse du réflexe somatique suite à l'injection KCl 10-AL 25. **p.166**

**Figure 2.24:** Modification de la réponse du réflexe somatique suite à l'injection AL 25-ATP. **p.167**

**Figure 2.25:** Modification de la réponse du réflexe somatique suite à l'injection KCl 50-AL 50. **p.168**

**Figure 2.26:** Exemple de la réponse des réflexes somatiques suite à l'activation des afférences des groupes III et IV chez un rat du groupe SHAM et MCAO-J1. **p.169**

**Figure 2.27:** Modification du réflexe POST-PPADS après injections de métabolites. **p.170**

**Figure 2.28:** Modification de la réponse du noyau VPL ipsi- et controlatéral suite à l'injection de différentes combinaisons de métabolites. **p.172**



**Figure 2.29:** Illustration de coupes de cerveau d'un même animal, colorées avec du crésyl violet mettant en évidence l'emplacement des électrodes dans le thalamus et plus précisément dans le VPL. **p.173**

**Figure 2.30:** Illustration de coupes de cerveau colorées avec du TTC mettant en évidence la taille de la lésion sur un rat sacrifié un jour (J1) et un autre 7 jours (J7) après la MCAo-r. **p.174**

**Figure 2.31:** Illustration de quelques structures cérébrales touchées par l'ischémie cérébrale induite par la MCAo-r. **p.175**

## **Chapitre 3**

**Figure 3.1:** Illustration des effets des DAMPS sur l'activation de la microglie résidente après un AVC. **p.194**

**Figure 3.2:** Les différentes formes de la microglie. **p.195**

**Figure 3.3:** Les différentes fonctions établies de la microglie selon le phénotype M1 et M2. **p.197**

**Figure 3.4:** Évolution du rôle de la microglie après l'ischémie cérébrale. **p.199**

**Figure 3.5:** Effets biologiques du BDNF au niveau synaptique. **p.202**

**Figure 3.6:** Rôle des co-transporteurs KCC2 et NKCC1 dans la réponse GABAergique. **p.207**

**Figure 3.7:** Exemple de cascade d'événements sous-tendant la modulation de l'homéostasie du Cl<sup>-</sup> par des agents endogènes. **p.209**

**Figure 3.8:** Impact d'un AVC sur le VO<sub>2pic</sub> et conséquences sur les AVQ. **p.211**

**Encadré 3.1:** La rééducation fonctionnelle post-AVC. **p.213**

**Figure 3.9:** Les différents types d'exercices recommandés post-AVC. **p.214**

**Encadré 3.2:** Modalité d'exercice chez le patient AVC: tapis roulant ou cyclo-ergomètre? **p.215**

**Figure 3.10:** Exemples de protocoles d'entraînement aérobique. **p.227**

**Figure 3.11:** Effet de différents types d'entraînement d'endurance chez le sujet sain sur la fonction cardiovasculaire et métabolique. **p.229**

**Encadré 3.3:** Effets des HIT sur les personnes présentant des troubles cardiovasculaires. **p.229**

**Figure 3.12:** Effet des HIT chez le patient AVC sur (A) la VO<sub>2pic</sub> et le TM-6 (B). **p.232**

**Encadré 3.4:** Quand faut-il commencer l'entraînement post-AVC? **p.234**

**Figure 3.13:** Détermination des 3 zones d'intensité en fonction des SV1 et SV2 lors d'un test d'effort incrémental à intensité croissante et maximale. **p.241**

**Figure 3.14:** Exemple d'une courbe de lactate obtenue au cours d'un test d'effort incrémental. **p.242**

**Figure 3.15:** Tapis roulant utilisé pour les tests d'effort et les entraînements d'endurance. **p.248**

**Figure 3.16:** Protocole du prélèvement de lactate et de l'épreuve d'effort incrémentale sur tapis roulant. **p.250**

- Figure 3.17:** Coupe coronale de cerveau illustrant l'expression de la protéine Iba-1 7 jours post-ischémie cérébrale chez le rat. **p.252**
- Tableau 3.1:** Informations générales sur les anticorps utilisés en immunofluorescence et en western blotting. **p.257**
- Tableau 3.2:** Caractéristiques des séances de rééducation en terme d'intensité d'exercice, de durée et de la charge de travail totale. **p.259**
- Figure 3.18:** Test de force de préhension. A) Force de préhension exercée par la patte antérieure gauche, B) Force G/D. **p.262**
- Figure 3.19:** Test de suspension par la queue. **p.263**
- Figure 3.20:** Test de l'échelle inclinée. **p.264**
- Figure 3.21:** Lactatémie mesurée au repos. **p.265**
- Figure 3.22:** Évolution de la performance en endurance PRE et POST entraînement. A) Vitesse correspondante au SL ( $V_{SL}$ ) et à  $V_{max}$  (m/min) à J1 après l'ischémie cérébrale. **p.268-269**
- Figure 3.23:** Marquage immunohistologique de la protéine Iba-1 au niveau péri-ischémique de l'hémisphère ipsilatéral. **p.270**
- Figure 3.24:** Marquage immunohistologique de la protéine Iba-1 au niveau de l'hémisphère controlatéral. **p.271**
- Figure 3.25:** Exemple de marquage immunohistologique de la protéine p75<sup>NTR</sup> au niveau ipsilatéral à la lésion. **p.272**
- Figure 3.26:** Intensité de la protéine p75<sup>NTR</sup> normalisée à celle du groupe SHAM dans les 2 hémisphères. **p.273-274**
- Figure 3.27:** Ratio entre l'expression de NKCC1 par rapport à l'expression de KCC2. **p.275**
- Figure 3.28:** Taille de la lésion avant et après l'entraînement. **p.276**

# Introduction générale

« Le 13 avril 1737.  
- Ce sont les contrariétés qui sont cause de ça, [...].  
- Quel âge a-t-il ?  
- Cinquante deux ans [...].  
- Mauvais âge. Il a travaillé comme un bœuf [...].  
Le docteur Jenkins se pencha un peu plus au-dessus de lui. Il remarqua qu'un œil, le droit, était fixe et l'autre vivant. Afin de mieux se rendre compte, il lui souleva le bras droit. Il retomba comme mort. Il fit la même chose avec le gauche, qui garda sa nouvelle position. Le docteur Jenkins en savait assez. Lorsqu'il quitta la chambre, Schmidt le suivit sur le palier, inquiet, bouleversé, et voulut savoir quel était le mal qui venait de terrasser son maître.  
- Une attaque d'apoplexie. Le côté droit est paralysé. [...]  
- Et...est ce qu'il guérira ?  
- Peut être, tout est possible.  
- Restera-t-il paralysé ?  
- Probablement, à moins d'un miracle.  
- Pourra-t-il au moins retravailler ? Il lui est impossible de vivre sans créer.  
- Cela, jamais plus, dit-il doucement. Nous pourrions peut-être conserver l'homme. Nous avons perdu le musicien. L'attaque d'apoplexie a touché le cerveau. »  
Stefan Zweig, "Les très riches heures de l'humanité",  
La résurrection de Georges-Frédéric Haendel

Cet extrait de « *La résurrection de Georges-Frédéric Haendel* » de Stefan Zweig illustre bien les répercussions physiques, cognitives et sociétales d'un Accident Vasculaire Cérébral (AVC). Ces quelques lignes montrent également que l'AVC (ou apoplexie, signifiant « frappé avec violence » en grec ancien) a longtemps été considéré comme une pathologie incurable associée, de manière fataliste, à la dégénérescence du corps liée au vieillissement (Theofanidis, 2015). L'AVC se définit aujourd'hui comme une perte soudaine des fonctions neurologiques résultant d'une perturbation de la circulation sanguine cérébrale (Somes & Bergman, 2007). Les déficits d'un tel traumatisme sont variables, allant des désordres sensorimoteurs aux troubles cognitifs (Khaja & Grotta, 2007). Les patients survivants sont près de la moitié à souffrir de troubles de la motricité qui sont responsables

d'un déconditionnement physique entraînant une perte d'autonomie et une diminution de la qualité de vie (Ivey *et al.*, 2006; Billinger *et al.*, 2014).

L'AVC reste aujourd'hui un problème de santé publique considéré comme une véritable épidémie mondiale (Di Carlo, 2008). Cette pathologie est reconnue comme la 2<sup>ème</sup> cause de mortalité dans le monde (10 % des causes de décès) avec une prévalence mondiale de 33 millions de personnes et une incidence de l'ordre de 17 millions de nouveaux cas par an (Mozaffarian *et al.*, 2015). Chaque année en France, 130 000 personnes sont victimes d'un AVC, soit 1 toutes les 4 minutes. Le risque de récurrence d'un 2<sup>ème</sup> AVC est également important puisqu'il est de 10 % durant la première année et de près de 20 à 30 % au cours des 5 premières années post-AVC (Go *et al.*, 2013). D'ici 2030, il est attendu environ 70 millions de cas dans le monde (Mukherjee & Patil, 2011; Feigin *et al.*, 2014). Avec la baisse de la mortalité (chute de 35,8 % à 22,8 % entre 2000 et 2010), la prise en charge des patients AVC est associée à un coût financier annuel toujours plus important ( $\approx$  65,5 milliards et 27 milliards de dollars respectivement aux États-Unis et dans les 27 pays de l'Union Européenne en 2008) (Di Carlo, 2008; Go *et al.*, 2013).

Pourquoi cette pathologie est-elle si fréquente dans le monde ? Selon une étude menée sur 22 pays, l'hypertension artérielle est responsable de 52 % des AVC (O'Donnell *et al.*, 2010). Beaucoup d'autres facteurs de risques connus sont liés au style de vie (*e.g.* tabagisme, alcool, alimentation, stress psychosociale, sédentarité) ou sont la conséquence de facteurs de comorbidité préexistants comme les troubles cardiovasculaires et/ou métaboliques (O'Donnell *et al.*, 2010). Bien que le risque de subir un AVC est doublé chaque décennie à partir de l'âge de 55 ans, il n'affecte pas que la population âgée (25 % des patients < 65 ans) ce qui empêche une large proportion d'entre eux ( $\approx$  50 % des patients) de reprendre une activité professionnelle (Bejot *et al.*, 2008; Marini *et al.*, 2011).

L'AVC peut se produire suite à 2 phénomènes vasculaires distincts :

- l'AVC hémorragique (20 % des cas) qui est la conséquence de la rupture d'un vaisseau sanguin fragilisé, entraînant ainsi un saignement intracérébral ou sous-arachnoïdien.

- l'AVC ischémique (80 % des cas) qui se produit lorsqu'un caillot de sang vient obstruer la lumière d'une artère cérébrale bloquant ainsi brutalement les débits sanguins dans la région du cerveau (Somes & Bergman, 2007; Casals *et al.*, 2011). Les neurones sont alors privés de l'apport d'O<sub>2</sub> et de nutriments indispensables à leur survie. L'ischémie est dite « focale » puisqu'elle affecte directement la partie du territoire cérébral irriguée par l'artère obstruée. L'obstruction est liée soit à une thrombose soit à une embolie cérébrale. La thrombose résulte de la formation d'un caillot sanguin, ou du détachement d'une plaque d'athérome, au sein d'une artère cérébrale alors que l'embolie cérébrale résulte de la formation d'un caillot sanguin dans un vaisseau extérieur au cerveau qui va migrer jusqu'à ce dernier. Ce travail de thèse portera sur l'ischémie cérébrale, centré autour de 2 axes de recherche dont les objectifs seront d'une part de dégager des mécanismes responsables des altérations des voies réflexes contribuant aux déficits fonctionnels, et d'autre part, de tester différents programmes d'endurance sur la récupération fonctionnelle et la plasticité cérébrale.

### **Axe 1 : Plasticité post-ischémique au niveau spinal**

Il est largement admis qu'une connaissance approfondie de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale est une étape incontournable afin d'établir, *in fine*, des thérapies appropriées. Pour cela, l'utilisation de modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale chez le rongeur a permis durant les 4 dernières décennies de dégager des mécanismes neurochimiques propres à la zone ischémique (Grupke *et al.*, 2015; Kleinschitz *et al.*, 2015). Cependant, de nombreuses études pointent l'absence de corrélation entre la sévérité de la lésion cérébrale et l'évolution des déficits fonctionnels suggérant que la réorganisation du SNC dans les zones

cérébrales épargnées influence les déficits moteurs et/ou cognitifs observés (Pantano *et al.*, 1996; Cenci *et al.*, 2002; Durukan & Tatlisumak, 2007; de Vries *et al.*, 2011). Il apparaît donc nécessaire d'élargir les zones d'analyses pour mieux comprendre l'évolution des déficits induits par l'ischémie cérébrale. Dans ce contexte, les altérations de la régulation de la fonction neuromusculaire au niveau de la moelle épinière, en lien direct avec l'encéphale, peuvent contribuer à expliquer les déficits observés. De manière surprenante, la réorganisation du SNC au niveau spinal a été rarement étudiée suite à une ischémie cérébrale. Il a pourtant été montré que l'activité des réflexes somatiques spinaux (mesurée à partir du réflexe de Hoffman ou réflexe-H) pouvait être amplifiée chez les patients AVC au repos ou lors de tâches locomotrices (Hwang *et al.*, 2004; Schindler-Ivens *et al.*, 2008; Phadke *et al.*, 2012; Cho & Lee, 2013; Liang & Brown, 2015). Plusieurs auteurs suggèrent donc que les mécanismes d'inhibition au niveau spinal, indispensables pour la régulation de l'activité motrice, pourraient être perturbés après l'ischémie. Cependant, aucune étude n'a évalué les mécanismes d'inhibition des réflexes spinaux suite à une ischémie cérébrale. Afin de mettre en évidence ce phénomène, il paraît intéressant dans un premier temps de solliciter ces mécanismes d'inhibition à partir d'un stimulus puissant pour déterminer si l'amplitude réflexe est toujours atténuée suite à l'ischémie. Pour cela, il est maintenant bien connu qu'une contraction musculaire isométrique intense et prolongée induit une diminution des réflexes somatiques pendant et après l'exercice liée aux informations transmises par les afférences qui sont sensibles aux variations chimiques et mécaniques du muscle actif (Adreani *et al.*, 1997; Garland *et al.*, 1997; Pettorossi *et al.*, 1999; Kalezic *et al.*, 2004; Laurin *et al.*, 2010). Dans ce cadre, l'exercice physique représente un outil de diagnostic qui pourrait déceler des dysfonctions difficilement identifiables au repos.

**L'enjeu du premier axe, et qui constituera les 2 premières études de ce manuscrit, sera donc de mettre en évidence chez le rat les perturbations potentielles de l'activité inhibitrice des réflexes somatiques en situation d'exercice fatigant et de dégager les mécanismes d'adaptation neuromusculaire au cours de la première semaine post-ischémique.**

Pour répondre à cette problématique, l'amplitude du réflexe-H du *triceps brachii* sera mesurée avant et après un exercice isométrique du muscle en question ce qui nous permettra également d'évaluer l'impact de l'ischémie cérébrale sur la fatigabilité musculaire. Ensuite, l'activité des afférences musculaires métabosensibles, activées au cours et à la suite d'un exercice isométrique et impliquées dans la régulation du réflexe somatique, sera analysée à différents étages (musculaire, spinal et supraspinal) afin de cibler précisément la zone où leur action pourrait être perturbée chez les animaux ayant subi une ischémie cérébrale. En effet, la fréquence de décharge de ces fibres sensorielles sera enregistrée suite à l'application de stimuli spécifiques au niveau musculaire. La réponse des réflexes somatiques du *triceps brachii* suite à l'activation spécifique de ces mêmes afférences sera testée. Enfin, l'activité du thalamus (côté ipsi- et controlatéral), une structure sous-corticale servant de zone d'intégration de toutes les informations somatosensorielles, sera enregistrée à la suite de l'activation spécifique des afférences métabosensibles.

### **Axe 2 : Exercices prolongés de différentes intensités, neuroplasticité et récupération fonctionnelle**

En l'absence de traitements pharmacologiques efficaces, les exercices de rééducation fonctionnelle représentent un moyen efficace pour lutter contre les conséquences délétères de l'AVC. Pour optimiser la récupération fonctionnelle, il est nécessaire de stimuler la neuroplasticité pour compenser/récupérer l'activité des réseaux neuronaux endommagés et

favoriser la formation de nouveaux circuits nerveux. La neuroplasticité spontanée étant insuffisante, de nombreuses études précliniques tentent de la stimuler à partir de divers traitements.

Des études récentes montrent que l'entraînement en endurance peut constituer un moyen pour potentialiser la neuroplasticité et la récupération fonctionnelle (Ke et al, 2011 ; Schmidt et al, 2014). Néanmoins, les recommandations actuelles pour les programmes d'exercice physique préconisent l'utilisation d'exercices prolongés d'intensité modérée (Matsuda et al., 2011; Globas et al., 2012; Boyne et al., 2016). Cependant, quelques auteurs postulent que les exercices de hautes intensités sont faisables et sans risques chez le patient AVC et pourraient se révéler encore plus efficaces mais les preuves manquent à ce jour. Dans ce cadre, l'influence de l'intensité d'exercice sur la neuroplasticité reste encore largement inconnue ainsi que ses effets sur la récupération fonctionnelle. De façon similaire aux traitements pharmacologiques, il est nécessaire de déterminer la dose optimale efficace pour le patient ainsi que les risques associés (Høydal et al., 2007; Billinger et al., 2014).

Le 2<sup>ème</sup> axe de recherche de ce travail de thèse portera donc sur l'influence de différentes intensités d'entraînement dans la récupération post-ischémique. Plus précisément, **la 3<sup>ème</sup> étude consistera à comparer les effets des exercices d'intensités modérées (MOD) avec ceux réalisés à des intensités élevées (« High-Intensity Interval Training », HIT) sur la récupération fonctionnelle et la neuroplasticité cérébrale chez le rat.** Dans ce travail de recherche, les connaissances issues de la physiologie de l'exercice, rarement pris en compte dans les études chez le rongeur où les intensités sont en général définies de manière empirique, nous permettront de déterminer les charges d'entraînement à partir de paramètres physiologiques valides. Nous tenterons ainsi d'établir un socle méthodologique pour clarifier les effets des différentes intensités d'exercice non seulement sur la récupération fonctionnelle, mais aussi, sur les mécanismes de neuroplasticité.



- Adreani CM, Hill JM & Kaufman MP (1997). Responses of group III and IV muscle afferents to dynamic exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985**, **82**, 1811–1817.
- Bejot Y, Catteau A, Caillier M, Rouaud O, Durier J, Marie C, Di Carlo A, Osseby G-V, Moreau T & Giroud M (2008). Trends in incidence, risk factors, and survival in symptomatic lacunar stroke in Dijon, France, from 1989 to 2006: a population-based study. *Stroke J Cereb Circ* **39**, 1945–1951.
- Billinger SA, Arena R, Bernhardt J, Eng JJ, Franklin BA, Johnson CM, MacKay-Lyons M, Macko RF, Mead GE, Roth EJ, Shaughnessy M, Tang A & on behalf of the American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health, Council on Epidemiology and Prevention, and Council on Clinical Cardiology (2014). Physical Activity and Exercise Recommendations for Stroke Survivors: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **45**, 2532–2553.
- Boyne P, Dunning K, Carl D, Gerson M, Khoury J, Rockwell B, Keeton G, Westover J, Williams A, McCarthy M & Kissela B (2016). High-Intensity Interval Training and Moderate-Intensity Continuous Training in Ambulatory Chronic Stroke: Feasibility Study. *Phys Ther* **96**, 1533–1544.
- Casals JB, Pieri NCG, Feitosa MLT, Ercolin ACM, Roballo KCS, Barreto RSN, Bressan FF, Martins DS, Miglino MA & Ambrósio CE (2011). The use of animal models for stroke research: a review. *Comp Med* **61**, 305–313.
- Cenci MA, Wishaw IQ & Schallert T (2002). Opinion: Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* **3**, 574–579.
- Cho S-H & Lee J-H (2013). Comparison of the Amplitudes of the H-reflex of Post-stroke Hemiplegia Patients and Normal Adults during Walking. *J Phys Ther Sci* **25**, 729–732.
- Di Carlo A (2008). Human and economic burden of stroke. *Age Ageing* **38**, 4–5.
- Durukan A & Tatlisumak T (2007). Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* **87**, 179–197.
- Feigin VL et al. (2014). Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond Engl* **383**, 245–254.
- Garland SJ, Griffin L & Ivanova T (1997). Motor unit discharge rate is not associated with muscle relaxation time in sustained submaximal contractions in humans. *Neurosci Lett* **239**, 25–28.
- Globas C, Becker C, Cerny J, Lam JM, Lindemann U, Forrester LW, Macko RF & Luft AR (2012). Chronic Stroke Survivors Benefit From High-Intensity Aerobic Treadmill Exercise: A Randomized Control Trial. *Neurorehabil Neural Repair* **26**, 85–95.
- Go AS et al. (2013). Heart disease and stroke statistics—2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **127**, e6–e245.
- Grupke S, Hall J, Dobbs M, Bix GJ & Fraser JF (2015). Understanding history, and not repeating it. Neuroprotection for acute ischemic stroke: From review to preview. *Clin Neurol Neurosurg* **129**, 1–9.
- Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ & Ellingsen Ø (2007). Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **14**, 753–760.
- Hwang I-S, Lin C-F, Tung L-C & Wang C-H (2004). Responsiveness of the H reflex to loading and posture in patients following stroke. *J Electromyogr Kinesiol* **14**, 653–659.
- Ivey FM, Hafer-Macko CE & Macko RF (2006). Exercise rehabilitation after stroke. *NeuroRx J Am Soc Exp Neurother* **3**, 439–450.
- Kalezic I, Pilyavskii A., Maisky V., Kostyukov A., Windhorst U & Johansson H (2004). Distinctive pattern of c-fos expression in the feline cervico-lumbar spinal cord after stimulation of vanilloid receptors in dorsal neck muscles. *Neurosci Lett* **364**, 94–97.
- Khaja AM & Grotta JC (2007). Established treatments for acute ischaemic stroke. *Lancet Lond Engl* **369**, 319–330.
- Kleinschnitz C, Fluri F & Schuhmann M (2015). Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Des Devel Ther* **3445**.

- Laurin J, Dousset E & Decherchi P (2010). Modulation of the spinal excitability by muscle metabosensitive afferent fibers. *J Neurosci Res* n/a – n/a.
- Liang JN & Brown DA (2015). Impaired H-Reflex Gain during Postural Loaded Locomotion in Individuals Post-Stroke ed. Lebedev MA. *PLOS ONE* **10**, e0144007.
- Marini C, Russo T & Felzani G (2011). Incidence of Stroke in Young Adults: A Review. *Stroke Res Treat* **2011**, 1–5.
- Matsuda F, Sakakima H & Yoshida Y (2011). The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol Oxf Engl* **201**, 275–287.
- Mozaffarian D et al. (2015). Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **131**, e29–e322.
- Mukherjee D & Patil CG (2011). Epidemiology and the global burden of stroke. *World Neurosurg* **76**, S85–S90.
- O'Donnell MJ et al. (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *The Lancet* **376**, 112–123.
- Pantano P, Formisano R, Ricci M, Piero VD, Sabatini U, Pofi BD, Rossi R, Bozzao L & Lenzi GL (1996). Motor recovery after stroke: Morphological and functional brain alterations. *Brain* **119**, 1849–1857.
- Pettorossi VE, Torre GD, Bortolami R & Brunetti O (1999). The role of capsaicin-sensitive muscle afferents in fatigue-induced modulation of the monosynaptic reflex in the rat. *J Physiol* **515**, 599–607.
- Phadke CP, Robertson CT, Condliffe EG & Patten C (2012). Upper-extremity H-reflex measurement post-stroke: Reliability and inter-limb differences. *Clin Neurophysiol* **123**, 1606–1615.
- Schindler-Ivens S, Brown DA, Lewis GN, Nielsen JB, Ondishko KL & Wieser J (2008). Soleus H-reflex excitability during pedaling post-stroke. *Exp Brain Res* **188**, 465–474.
- Somes J & Bergman DL (2007). ABCDs of acute stroke intervention. *J Emerg Nurs JEN Off Publ Emerg Dep Nurses Assoc* **33**, 228–234.
- Theofanidis D (2015). From Apoplexy to Brain Attack, a Historical Perspective on Stroke to Date. *J Nurs Care*; DOI: 10.4172/2167-1168.1000e121.
- de Vries S, Tepper M, Otten B & Mulder T (2011). Recovery of Motor Imagery Ability in Stroke Patients. *Rehabil Res Pract* **2011**, 1–9.
-

# Chapitre I

## **Répercussions de l'ischémie cérébrale sur la régulation des réflexes somatiques durant la phase aigüe**

### **Sommaire**

---

- 1. Les principaux déficits associés à l'AVC**
  - 2. L'ischémie cérébrale : une physiopathologie complexe et évolutive**
  - 3. Évaluation des déficits suite à une ischémie cérébrale chez le rat**
  - 4. Réorganisation du système nerveux central après une ischémie cérébrale**
  - 5. Étude n°1 : Adaptations neuromusculaires induites par un exercice physique suite à une ischémie cérébrale chez le rat**
-

### 1. Les principaux déficits associés à l'AVC

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, l'AVC représente la 1<sup>ère</sup> cause de handicap moteur acquis dans le monde, la 2<sup>ème</sup> cause de démence et plus de la moitié des hospitalisations pour raisons neurologiques. De plus, 75 % des survivants présentent des séquelles persistantes liées à l'AVC. D'après la Haute Autorité de la Santé (HAS), 45 % des personnes souffrant de désordres post-AVC montrent des difficultés pour au moins une activité de la vie quotidienne affectant ainsi l'autonomie du patient (HAS, 2015).

L'AVC est donc une pathologie accompagnée de multiples désordres sensoriels, moteurs (souvent rassemblés sous le terme de troubles sensorimoteurs, car ces deux fonctions sont fortement interdépendantes) et cognitifs diminuant ainsi la qualité de vie du patient. La sévérité de la lésion est dépendante de la durée de l'ischémie, de l'étendue et de la localisation de l'infarctus qui sont donc les prédicteurs majeurs de l'ampleur et de la nature des déficits induits par l'AVC (Edwardson & Dromerick, 2016). Les déficits peuvent fortement différer d'un individu à un autre et interagissent les uns avec les autres. Par exemple, les déficits sensorimoteurs ont pour effet d'entraîner un déconditionnement physique aggravant ainsi les troubles cardiorespiratoires (Billinger *et al.*, 2012). Les désordres cognitifs sont également connus pour influencer l'efficacité de la récupération fonctionnelle et inversement (Patel *et al.*, 2002; Leśniak *et al.*, 2008). Dans les paragraphes qui vont suivre, nous allons mettre en évidence les principaux déficits induits par l'AVC.

#### 1.1 Les déficits sensorimoteurs

La conséquence directe la plus fréquemment observée est l'hémiplégie (Lawrence *et al.*, 2001; Hankey *et al.*, 2002). Cette dernière se définit comme une diminution plus ou moins importante de la motricité et de la sensibilité du côté opposé à l'hémisphère cérébral touché.

Lors d'une lésion sévère, il est possible d'observer une hémiplégie reflétant, cette fois, une perte totale des fonctions sensorimotrices.

Les atteintes sont différentes si le côté droit est touché par rapport au côté gauche. Une lésion d'un hémisphère peut engendrer une paralysie du côté opposé du corps mais aussi une aphasie<sup>1</sup> (spécifique à l'hémisphère gauche) ou une héminégligence<sup>2</sup> (spécifique à une lésion de l'hémisphère droit) (Khaja & Grotta, 2007; Constans *et al.*, 2016). Par ailleurs, une atteinte du tronc cérébral ou du cervelet peut conduire à des perturbations de la coordination motrice, des troubles de l'équilibre (vertiges, ataxie) ou encore à une dysphagie<sup>3</sup> (Khaja & Grotta, 2007).

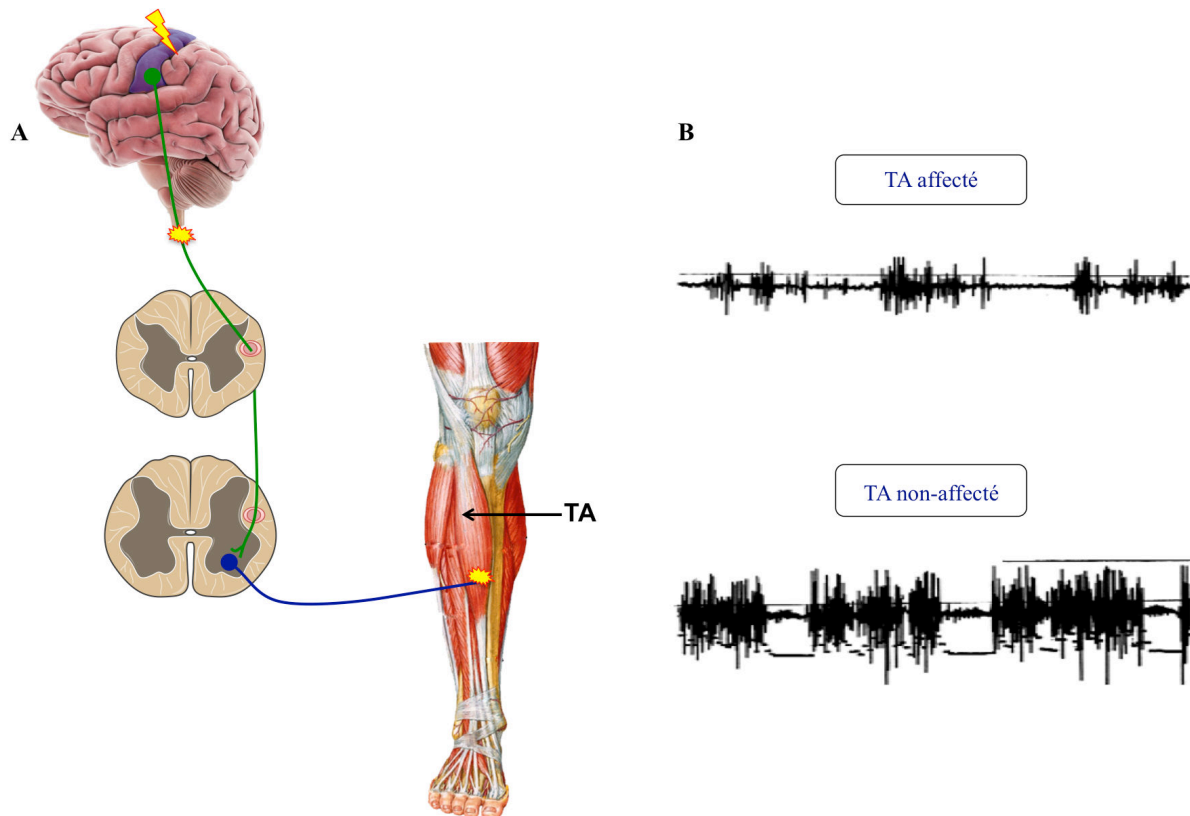
Une lésion neuronale au niveau des centres nerveux sensorimoteurs provoque inévitablement une perturbation de l'activité des voies motrices descendantes (*i.e.* voies corticospinale et/ou rubrospinale et/ou réticulospinale). Il en résulte alors immédiatement une altération complète ou non de la fonction neuromusculaire reflétée par une diminution de l'activation motoneuronale (*i.e.* baisse du recrutement motoneuronale et/ou de leur fréquence de décharge) (Canning *et al.*, 1999). Cette diminution de l'activation volontaire entraîne une diminution de la force maximale volontaire, associée à une baisse de l'activité électromyographique (EMG), et de la vitesse de montée en force (**Figure 1.1**) (Frontera *et al.*, 1997). Adam *et al.* (1990) ont rapporté que les muscles fléchisseurs et extenseurs sont affectés de manière similaire alors que les muscles distaux sont plus atteints que les muscles proximaux (Adams *et al.*, 1990).

---

<sup>1</sup> Perte partielle ou totale de la faculté à s'exprimer, à comprendre le langage parlé ou écrit, malgré l'intégrité anatomique et fonctionnelle des organes de la phonation, et indépendamment de toute atteinte neurologique d'origine sensorielle.

<sup>2</sup> Inconscience de l'existence de la partie corporelle opposée.

<sup>3</sup> Difficulté de déglutition



**Figure 1.1 : Perturbation de la commande motrice volontaire après une lésion du cortex cérébral.** L'activité neuronale du cortex moteur lésé est altérée perturbant la propagation de l'influx nerveux le long de la voie corticospinale jusqu'à la moelle épinière et au muscle (A). Comme illustré par la diminution de l'activité EMG des muscles du TA (Tibialis Anterior) de la jambe parétique (B), les unités motrices sont alors moins recrutées induisant ainsi une perte de la force musculaire. [Adaptée de (Frontera *et al.*, 1997)].

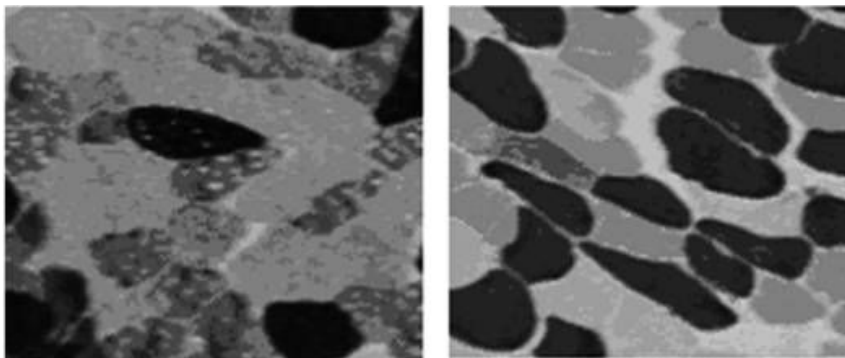
Les déficits sensorimoteurs post-AVC peuvent être liés à l'intégration des informations sensorielles d'origine musculaires et/ou articulaires impliquant de nombreuses régions cérébrales allant du cortex somatosensoriel au tronc cérébral. Par ailleurs, la nature des déficits sensoriels dépendent également de l'intégrité des voies sensorielles ascendantes au niveau spinal (*i.e.* voie spinothalamique et voie lemniscale). Les déficits somatosensoriels peuvent inclure une perturbation de la proprioception<sup>1</sup> et de l'extéroception<sup>2</sup>. L'ensemble des déficits sensorimoteurs peut être responsable de troubles de la coordination et de l'équilibre (très fréquents chez les patients AVC) perturbant fortement la locomotion des personnes atteintes d'un AVC (Pérennou & Bronstein, 2005).

<sup>1</sup> Capacité à détecter la position des différents segments corporels dans l'espace via les récepteurs musculaires, tendineux et articulaires.

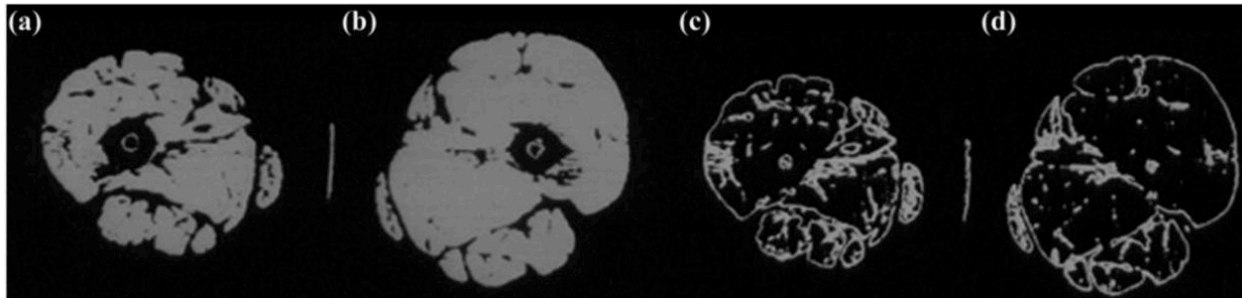
<sup>2</sup> Vision, audition, olfaction, gustation, température, douleur et discrimination sensorielle.

### 1.2 Les déficits cardiorespiratoires

Les altérations neuromusculaires favorisent l'immobilisation des patients et sont responsables d'un déconditionnement physique qui est à l'origine de l'apparition de différentes altérations secondaires. Parmi ces altérations, une modification du phénotype musculaire, de la composition corporelle ainsi qu'une atrophie musculaire sont observées, essentiellement du côté parétique avec une augmentation de la proportion de fibres musculaires rapides (type IIa) a été mise en évidence au dépend des fibres lentes (type I) (reflété par une transition des chaînes lourdes de myosines I ; MHC-I en MHC-II) (**Figure 1.2**) (Ryan *et al.*, 2002; Hafer-Macko *et al.*, 2008). Par ailleurs, il a été montré une augmentation de l'infiltration graisseuse intramusculaire (+ 25 %) et une baisse de la masse musculaire pouvant être associées à une insulino-résistance (**Figure 1.3**) (Hafer-Macko *et al.*, 2008). Ces auteurs postulent que la présence de marqueurs de l'inflammation au niveau des muscles parétiques semblent suggérer que l'activation de voies inflammatoires représentent un des mécanismes possibles à l'origine de l'atrophie musculaire et de la perturbation du métabolisme musculaire post-AVC (Hafer-Macko *et al.*, 2008). Dans ces études, il est indiqué que ces modifications myotypologiques sont associées à des troubles de la marche. Cependant, il est pour l'instant impossible d'identifier quel facteur influence l'autre.



**Figure 1.2** : Exemple de coupe transversale du muscle vaste latéral (VL) de la jambe parétique (gauche) et non parétique (droite) d'un patient AVC chronique marquées avec de l'adénosine triphosphate. Le tissu musculaire parétique montre 1) une proportion élevée de fibres musculaires rapides (type IIa ; en gris), 2) une atrophie relative des fibres rapides et intermédiaires (type IIx) et 3) une faible proportion de fibres lentes (type I ; en noir) comparées à la mosaïque d'une distribution égale de types de fibres sur la coupe musculaire du VL non parétique (Hafer-Macko *et al.*, 2008).



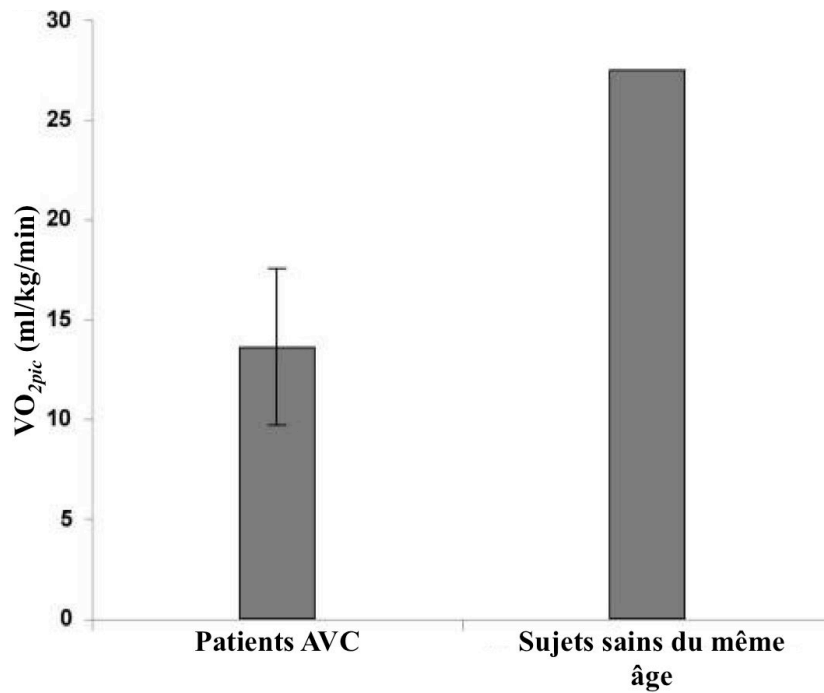
**Figure 1.3 :** Tomodensitométrie bilatérale des muscles de la cuisse chez des patients AVC chroniques. Nous pouvons observer une atrophie sévère (a) et une augmentation de l'infiltration graisseuse (c) du côté parétique comparé au côté non parétique (b, d) (Ryan *et al.*, 2002).

Des altérations des fonctions cardiovasculaires et respiratoires sont également associées aux modifications musculaires se traduisant par une diminution de la capacité d'endurance.

D'une part, la fonction cardiaque est affectée avec une diminution du débit cardiaque maximal, du volume d'éjection systolique maximal et de la fréquence cardiaque maximale (bien que controversée) (Rochester & Mohsenin, 2002; Billinger *et al.*, 2009, 2012). Chez le patient, on observe également une diminution du débit ventilatoire maximal avec une diminution du volume courant (Tomczak *et al.*, 2008). Au niveau vasculaire, des altérations hémodynamiques et métaboliques sont également relevées au niveau du côté controlatéral à la lésion où le diamètre des vaisseaux sanguins et les débits sanguins sont fortement diminués (-32 % jambe affectée vs. saine) (Billinger *et al.*, 2009, 2012). La pression artérielle systolique et diastolique est également diminuée au repos et lors d'un effort physique. Les débits sanguins musculaires étant limités, l'apport d'oxygène ( $O_2$ ) et de substrats énergétiques est réduit perturbant ainsi le fonctionnement métabolique musculaire.

L'ensemble de ces altérations contribue d'une part à une diminution de la puissance du métabolisme aérobie avec une réduction de la consommation maximale ou du pic maximal d'oxygène (*i.e.*  $VO_{2pic}$ ) (Marsden *et al.*, 2013). Les patients AVC présentent ainsi fréquemment un  $VO_{2pic}$  inférieur à 18 ml/kg/min, ce qui est considéré comme la valeur minimale nécessaire pour vivre de manière autonome (Figure 1.4) (Marsden *et al.*, 2013).





**Figure 1.4 :** Comparaison entre le  $VO_{2pic}$  de sujets hémiparétiques chroniques et d'individus sains du même âge sédentaires. Le  $VO_{2pic}$  des patients AVC (191 patients;  $13,6 \pm 3,9$  ml/kg/min) est 2 fois inférieur à celui des sujets sains (25-30 ml/kg/min) [Adaptée de (Ivey et al., 2005)].

D'autre part, une pénibilité accrue est observée aux intensités sous maximales (mesurée à partir du coût énergétique de la locomotion) (Ivey et al., 2005). D'une manière générale, la diminution des capacités fonctionnelles du patient est à l'origine de l'apparition d'une fatigue précoce durant la réalisation des tâches de la vie quotidienne aggravant l'autonomie du patient AVC (cf. Chapitre III, section 2.1.1 - p.211) (Billinger et al., 2012).

### 1.3 Les déficits cognitifs

Après un AVC, les patients sont également susceptibles de développer des troubles cognitifs. Ces derniers sont souvent sous-estimés ou confondus avec les désordres cognitifs associés à l'âge tels que ceux des pathologies neurodégénératives (Sun et al., 2014; Corriveau et al., 2016; Constans et al., 2016). Ainsi, il n'y a pas vraiment de traitement approprié à ce type de déficits post-AVC bien que de plus en plus de recherches, portant sur ce sujet, se développent. Les patients peuvent présenter des dysfonctions cognitives spécifiques à certaines

zones cérébrales comme des troubles du langage (*e.g.* aphasie), d'une héminégligence ou encore d'une apraxie<sup>1</sup>. Ce déficit neurologique concerne aussi bien la conceptualisation que l'exécution du geste proprement dit. Par ailleurs, on retrouve des désordres cognitifs globaux tels que des troubles de la mémoire, de la compréhension et une perturbation des fonctions exécutives (*e.g.* planification, raisonnement).

Il n'est pas rare que les patients AVC présentant des troubles cognitifs montrent un niveau de récupération fonctionnelle très faible (Rand *et al.*, 2010). Ceci suggère que les dysfonctions cognitives liées à l'AVC peuvent affecter la réalisation et l'apprentissage des mouvements complexes (*e.g.* locomotion, coordination bimanuelle) pour lesquels les ressources cognitives sont hautement impliquées (Temprado *et al.*, 2013).

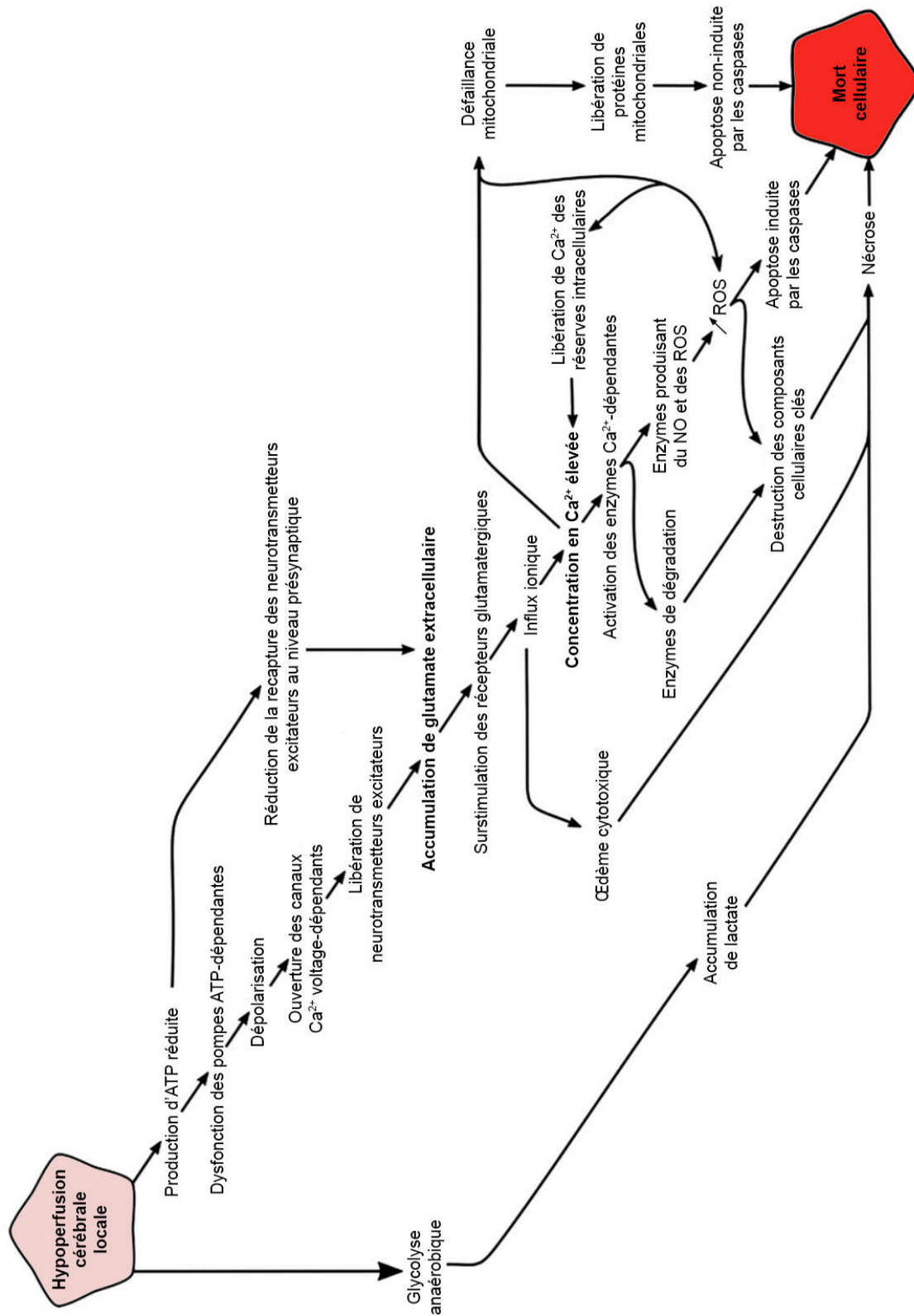
L'origine de l'ensemble des déficits décrits plus haut est liée à l'atteinte du tissu nerveux cérébral par l'ischémie, provoquée par la cascade ischémique.

## 2. L'ischémie cérébrale : une physiopathologie complexe et évolutive

La déplétion énergétique, conséquence directe de l'ischémie cérébrale, déclenche de nombreux mécanismes neurochimiques de détérioration des tissus qui font référence à un phénomène complexe et hétérogène, la cascade ischémique. La forte augmentation des concentrations de calcium intracellulaire ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induite par le manque d'énergie est particulièrement impliquée dans la plupart des mécanismes d'altération tissulaire tels que l'excitotoxicité, le stress oxydatif, la dysfonction de la barrière hémato-encéphalique (BHE), la réponse inflammatoire et enfin la mort cellulaire neuronale, gliale et endothéliale (*via* nécrose ou apoptose) (Figure 1.5) (Brouns & De Deyn, 2009). Malgré les nombreux travaux expérimentaux portant sur la cascade ischémique, la chronologie ainsi que les nombreux mécanismes impliqués ne sont pas totalement élucidés.

---

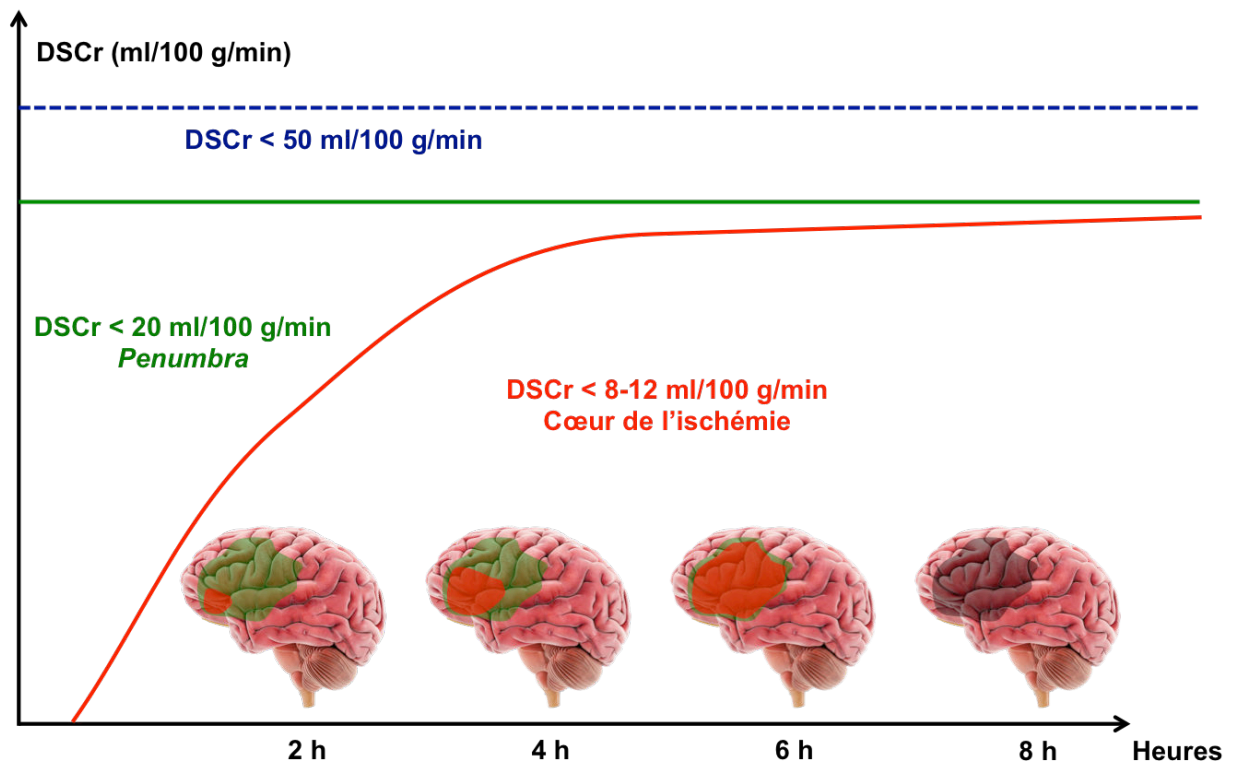
<sup>1</sup> Incapacité à effectuer un mouvement ou une série de mouvements bien que les zones motrices et sensorielles cérébrales ne soient pas atteintes.



**Figure 1.5 : Représentation schématique des différents mécanismes impliqués dans la cascade ischémique conduisant à la mort cellulaire après une ischémie cérébrale.** (ATP : adénosine-triphosphate ; NO : monoxyde d'azote ; ROS : espèces dérivées de l'oxygène ; Ca<sup>2+</sup> : calcium). (Adaptée de (Brouns & De Deyn, 2009)).

### *2.1 La chute du débit sanguin cérébral : caractérisation des zones ischémiques*

Le débit sanguin cérébral régional (DSCr) est un paramètre crucial dans la caractérisation de la lésion cérébrale puisqu'il permet de déterminer deux zones lésionnelles distinctes : le cœur de l'infarctus et la *penumbra* ischémique (**Figure 1.6**). Pour leur fonctionnement de repos, les cellules cérébrales consomment environ 20 % de l'oxygène total nécessaire au métabolisme de base corporel (Sokoloff, 1960). Étant donné que l'apport en oxygène et en glucose doit toujours être constant, le cerveau présente la capacité d'autoréguler son débit sanguin en dépit des variations de la pression artérielle, ce qui permet de s'affranchir de la réponse myogénique résultante (vasodilatation ou une vasoconstriction des muscles lisses des artères et artérioles cérébrales) (Lassen, 1959). Dans des conditions physiologiques normales, le DSCr est maintenu à environ 50-60 ml/100 g de tissus cérébraux/min et varie en fonction des régions cérébrales et de leur activité (Sokoloff, 1960). Lors d'une ischémie, il est observé une vasodilatation locale au niveau du site cérébral affecté pour compenser la réduction de DSCr. Ceci permet la vasodilatation des artères collatérales et augmente l'extraction du glucose et de l'O<sub>2</sub>. En revanche, lorsque le DSCr atteint 25 ml/100 g/min, un ralentissement de l'activité électrique de l'encéphale est observé. En dessous du seuil des 20 ml/100 g/min, l'activité synaptique est fortement diminuée dans le but de préserver les réserves énergétiques (perte de conscience). À un DSCr de 18 ml/100 g/min, l'homéostasie ionique est compromise et la production énergétique des neurones basculent sur le métabolisme anaérobie. Finalement, les dommages neuronaux deviennent irréversibles lorsque le DSCr descend en-dessous de 10 ml/100 g/min (Verweij *et al.*, 2007).



**Figure 1.6 :** *Évolution spatiale et temporelle d'une ischémie cérébrale aiguë.* En dessous de 20 ml/100 g/min, les cellules nerveuses vont subir des déficits plus ou moins réversibles en fonction de la durée de l'ischémie (Adaptée de (Verweij *et al.*, 2007)). Le cœur ischémique s'étend aux dépens de la pénombre. Cette évolution est variable et dépend de nombreux facteurs (collatérales artérielles, reperfusion). DSCr : débit sanguin cérébral régional.

### 2.1.1 Le Core : Cœur de l'ischémie

Le cœur de l'ischémie est la zone où le DSCr est sévèrement diminué, menant ainsi à des dommages neuronaux rapides (quelques minutes) et irréversibles (Figure 1.6) (Brouns & De Deyn, 2009). En effet, le DSCr diminue de plus de 15 % en dessous du seuil minimal pour la survie des neurones entraînant une réduction de 25 % d'adénosine triphosphate (ATP) (Smith, 2004). La nécrose est la cause principale de la mort neuronale dans cette zone et se produit rapidement après l'occlusion d'une artère cérébrale. Elle est secondaire à des processus de mort cellulaire d'origine cytoplasmique où la libération massive de calcium joue un rôle important. Lors de la nécrose, l'infiltration abondante d'ions et d'eau, renforcée par la perméabilisation de la membrane plasmique provoque un œdème dans la cellule. Ainsi la nécrose est caractérisée par la dégradation du cytosquelette résultant d'une perte de

l'architecture cellulaire (Smith, 2004). De plus, la dégradation nucléaire se fait par *karyolysis*, processus menant à la dissolution totale de la chromatine [*i.e.* forme sous laquelle se présente l'acide désoxyribonucléique (ADN), l'acide ribonucléique (ARN) et les protéines]. Finalement, la cellule explose, libérant son contenu dans l'espace extracellulaire et conduisant à une inflammation (Figure 1.7).

### 2.1.2 La *penumbra* ischémique

La *penumbra* se définit comme étant la zone cérébrale ischémique séparant le cœur de l'ischémie et la partie intacte du cerveau. Les artères collatérales assurent le maintien de la perfusion sanguine malgré une diminution du DSCr de 15 à 45 % par rapport aux tissus normaux (Smith, 2004). Bien que l'activité métabolique soit préservée, la production d'ATP chute de 50 à 70 % par rapport à des conditions physiologiques normales. Dans cette région, l'intégrité structurelle des tissus n'est pas affectée contrairement à leur fonctionnement. Cette zone est particulièrement altérée par la réponse inflammatoire et l'excitotoxicité qui se propagent depuis du cœur de l'ischémie ou de la *penumbra* elle-même.

Il existe une période critique, la « fenêtre d'opportunité », durant laquelle l'altération des tissus viables dans cette zone est partiellement, voir totalement, réversible. En l'absence de reperfusion sanguine, la *penumbra* est fatalement amenée à être dégradée avec l'augmentation de la durée post-ischémique entraînant la mort cellulaire programmée, l'apoptose. Ce processus nécessite un apport énergétique pour fonctionner. Pour cette raison, elle se déroule surtout au niveau de la *penumbra*. Tout d'abord, la cellule s'atrophie sans altération de la membrane plasmique. Le noyau se fragmente et l'ADN s'émiette. Le contenu cellulaire est alors libéré sous forme de corps apoptotiques avant d'être phagocytés par les globules blancs. L'apoptose n'engendre pas d'inflammation contrairement à la nécrose et se déroule sur plusieurs jours (Figure 1.7).

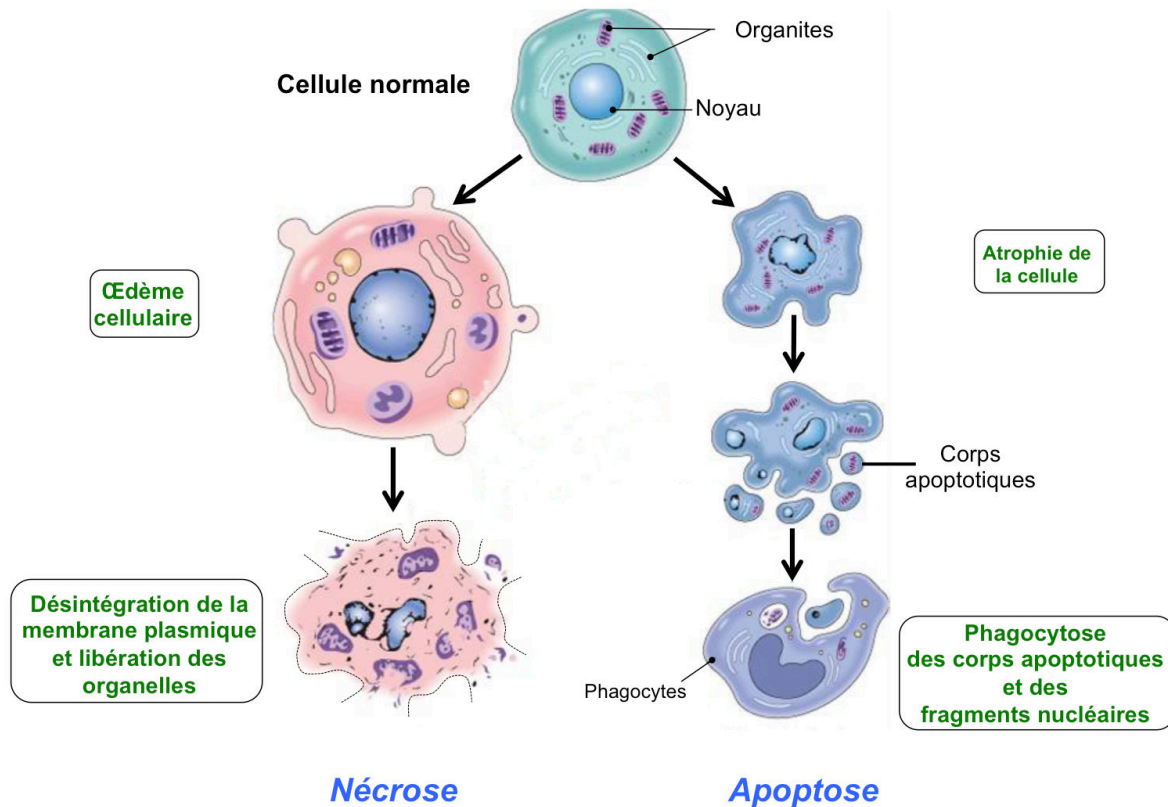


Figure 1.7 : Les différences majeures entre le processus de nécrose et le processus d'apoptose.

## 2.2. Défaillance bioénergétique cellulaire et dérégulation de l'homéostasie ionique

La production énergétique nécessaire à l'encéphale dépend essentiellement de la phosphorylation oxydative. En l'absence d'O<sub>2</sub>, la production d'énergie dans les cellules nerveuses est alors assurée par la glycolyse anaérobie qui augmente l'acidose tissulaire dans la zone ischémique. La quantité d'ATP produite par la voie anaérobie est 15 fois moins élevée que celle obtenue dans des conditions aérobies (Smith, 2004; Verweij *et al.*, 2007). L'accumulation importante de lactate et surtout de protons (H<sup>+</sup>) induit une diminution du pH, une augmentation de la formation de radicaux libres responsable du stress oxydant, une dérégulation de l'homéostasie ionique et de la dégradation des structures cellulaires et favorise l'entrée de Ca<sup>2+</sup> dans la cellule (Siesjö, 1988).

La chute drastique des réserves en ATP dans les 2 minutes post-ischémique mènent à une dysfonction de tous les autres processus ATP-dépendants dont celui des pompes ioniques ATP-dépendantes (Smith, 2004). En effet, la majorité de l'énergie générée par le cerveau (70 %) est utilisée dans la maintenance de l'homéostasie intracellulaire et des gradients ioniques transmembranaires (*i.e.* sodium,  $\text{Na}^+$ ; potassium,  $\text{K}^+$ ; calcium,  $\text{Ca}^{2+}$  et chlore,  $\text{Cl}^-$ ) (Doyle *et al.*, 2008). La perturbation des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-dépendantes entraîne alors une modification de la concentration ionique dans les milieux intra- et extracellulaire provoquant la dépolarisation membranaire excessive et non-contrôlée des neurones et des cellules gliales dans le cœur ischémique. De plus, l'accumulation excessive de  $\text{Na}^+$  dans le milieu intracellulaire est accompagnée par une entrée massive de fluides extracellulaires (essentiellement de l'eau) dans les cellules conduisant à un œdème cytotoxique<sup>1</sup> (Rosenberg, 1999). Enfin, les pompes  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, les  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  échangeurs et les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendants sont également perturbés induisant une accumulation massive de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu intracellulaire déclenchant, entre autre, une excitotoxicité.

### ***2.3 Excitotoxicité et diffusion des ondes de dépolarisation dans la penumbra***

L'excitotoxicité contribue à la mort neuronale par deux mécanismes : la nécrose et l'apoptose (Smith, 2004). L'entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  provoque une libération importante et incontrôlée des neurotransmetteurs excitateurs dans la synapse (*i.e.* glutamate, aspartate et dopamine) provoquant une dépolarisation excessive des cellules cérébrales. L'accumulation de glutamate est renforcée par la diminution de la recapture de ces neurotransmetteurs due à la défaillance énergétique (transporteurs membranaires du glutamate) car cette action requiert la présence d'ATP (Choi & Rothman, 1990). Ainsi, les grandes quantités de glutamate extracellulaires induisent à leur tour une stimulation excessive de leurs récepteurs

---

<sup>1</sup> Œdème se formant très rapidement suite à l'ischémie cérébrale et résultant d'une augmentation massive d'eau et de  $\text{Na}^+$  dans le parenchyme cérébral. Dans ce type d'œdème, l'intégrité de la BHE n'est pas atteinte.



métabotropiques, les récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid (AMPA) et N-Méthyl-D-aspartic acid (NMDA). L'hyperactivation de ces récepteurs accentue et entretient l'augmentation intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule (surtout les NMDA en dérégulant l'influx  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ), qui une fois encore entraîne une libération de glutamate. Ainsi, il est observé une amplification locale de la lésion initiale à travers le cycle du  $\text{Ca}^{2+}$ . La mort neuronale intervient rapidement par cytotoxicité *via* l'accumulation de glutamate et de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Par ailleurs, les ondes de dépolarisation excessives en provenance des bordures du cœur de l'ischémie se propagent jusqu'à la zone de la *penumbra* contribuant à étendre la zone lésée (Smith, 2004; Heiss, 2010). Ces ondes entraînent une activation répétée des pompes ioniques qui consomment une grande quantité d'énergie faisant chuter le niveau d'ATP sans que celui soit renouvelé à cause de l'ischémie. Il en résulte alors des dommages tissulaires pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire (Doyle *et al.*, 2008).

### ***2.4 Le stress oxydant et la dégradation cellulaire : altération de la barrière hématoencéphalique***

La forte concentration intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  active également les enzymes calcium-dépendantes telles que les protéases, les lipases, les cyclooxygénases ou encore les désoxyribonucléases menant 1) à la dégradation structurelle des cellules et 2) la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, « *reactive oxygen species* ») (Edvinsson & Krause, 2002). Dans des conditions physiologiques, les ROS, incluant l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), le peroxyde hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et les radicaux hydroxyles ( $\text{OH}^\cdot$ ), sont générés à de faibles concentrations et jouent un rôle important au niveau métabolique. Le taux de ROS est contrôlé par les antioxydants tels que le superoxide dismutases, le glutathione peroxydase, le glutathione et les catalases. L'augmentation des ROS induite par l'ischémie cérébrale est accompagnée par l'inactivation des antioxydants privant ainsi les neurones de protection contre les effets des

ROS. Ces derniers vont causer des dommages tissulaires soit directement en participant à la destruction des protéines cellulaires, des lipides et de l'ADN, soit indirectement en bloquant les voies de signalisation cellulaire et la régulation des gènes (Broughton *et al.*, 2009). Les mitochondries représentent la source principale de production de ROS, fortement impliquées dans le déclenchement de l'apoptose (Watts *et al.*, 2013). En effet, la perméabilisation de la membrane mitochondriale suite à l'ischémie cérébrale provoque la libération des protéines mitochondriales (*e.g.* cytochrome *c*) dans le cytosol. Ces dernières sont responsables de l'activation des voies apoptotiques, entre autres, par l'activation des voies caspases-dépendantes. De plus, l'ischémie cérébrale induit une perturbation de la biogenèse mitochondriale<sup>1</sup> participant à l'extension de l'ischémie neuronale (Onyango *et al.*, 2010).

L'altération de la BHE se traduit par une augmentation de sa perméabilité, qui est un élément majeur de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. Le stress oxydant est le responsable de la dégradation microvasculaire se traduisant par une diminution de la perméabilité des cellules endothéliales. Ce phénomène est associé à une production excessive de métalloprotéinases matricielles<sup>2</sup> (MMPs) (particulièrement la MMP-9) endommageant sévèrement les matrices extracellulaires de la BHE (Asahi *et al.*, 2000, 2001). L'altération de la BHE induit, entre autres, l'infiltration des cellules inflammatoires et du sang sur le site de la lésion. Cette extravasation (*i.e.* déplacement de fluide) peut d'une part entraîner un œdème vasogénique<sup>3</sup> et d'autre part, une hémorragie. Ces 2 phénomènes sont responsables d'une hypertension intracrânienne aggravant ainsi les dommages cérébraux. Par ailleurs, l'altération des cellules endothéliales induit une vasoconstriction par la réduction de la libération de monoxyde d'azote (NO) et l'augmentation de l'endothéline-1 (ET-1), un puissant

---

<sup>1</sup> *Processus par lesquels les mitochondries augmentent leur masse et leur nombre.*

<sup>2</sup> *Enzymes protéolytiques (protéases) ayant pour rôle de modifier (dissoudre) la matrice extracellulaire, réseau de protéines fibreuses qui comble l'espace entre les cellules.*

<sup>3</sup> *Ce type d'œdème résulte d'une augmentation de la perméabilité de la BHE permettant la pénétration dans les espaces extracellulaires d'un liquide d'origine plasmique riche en protéine.*

vasoconstricteur. Cette vasoconstriction accentue les perturbations de la circulation sanguine dans la zone infarctée.

### ***2.5 La réponse inflammatoire post-ischémique contribue aux dommages cérébraux***

L'ischémie cérébrale engendre une réaction inflammatoire qui est un facteur majeur de la progression de la lésion initiale. En effet, cette réponse inflammatoire amplifie les dommages cellulaires, la dégradation microvasculaire et la perméabilité de la BHE. Les éléments clés constituant cette réponse sont les cellules inflammatoires (*i.e.* leucocytes et cellules gliales), les molécules de signalisation (*i.e.* médiateurs) et les molécules d'adhésion<sup>1</sup>. Ces éléments fonctionnent en synergie et ont une influence les uns sur les autres conduisant à la mort cellulaire.

L'augmentation de l'expression des médiateurs de l'inflammation (*e.g.* cytokines) est stimulée par les cellules nécrosées, la génération de ROS et autres cellules nerveuses (*i.e.* microglie, astrocyte) activées à la suite de l'ischémie cérébrale (Wang *et al.*, 2007). Ces médiateurs induisent alors la production de molécules d'adhésion par les leucocytes et les cellules endothéliales comme les sélectines (P et E) et les immunoglobulines [ICAM-1 (« *InterCellular Adhesion Molecule* »), VCAM-1 (« *Vascular cell adhesion protein* ») et les PECAM-1 (« *Platelet endothelial cell adhesion molecule* »)]. Les sélectines sont principalement impliquées dans le recrutement et le roulement des leucocytes sur la paroi endothéliale vers le site ischémique alors que les immunoglobulines favorisent l'immobilisation des leucocytes sur la paroi vasculaire (Jin *et al.*, 2013).

Parmi les cellules inflammatoires sanguines de la famille des leucocytes circulant, les neutrophiles sont les premières à être recrutées et à s'infiltrer dans le parenchyme cérébral.

---

<sup>1</sup> Molécules permettant aux leucocytes d'adhérer aux parois vasculaires de l'endothélium et de pénétrer sur le site de la lésion.

Ces cellules sont impliquées dans la libération de médiateurs pro-inflammatoires (e.g. cytokines), la génération de ROS et de protéases<sup>1</sup> (Wang *et al.*, 2007). Il apparaît que les neutrophiles, les lymphocytes et les monocytes/macrophages (autres leukocytes) jouent un rôle délétère contribuant au développement de la lésion secondaire dans la *penumbra*.

L'inflammation est également favorisée par les cellules cérébrales résidentes : les astrocytes et la microglie (Wang *et al.*, 2007; Liu & Chopp, 2016). Les astrocytes<sup>2</sup> sont présents en abondance dans le SNC et deviennent rapidement activés suite à l'ischémie cérébrale faisant référence à l'astroglie réactive (Liu & Chopp, 2016). Ces cellules subissent alors une modification fonctionnelle en participant à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires et d'agents cytotoxiques. Une modification structurelle intervient également, représentée par une hypertrophie cellulaire particulièrement observable à partir de l'augmentation de l'expression de ses filaments intermédiaires composés de protéines acides fibrillaires gliales (GFAP). Ces filaments s'allongent et se propagent dans les environs du site ischémique formant une cicatrice gliale imposante, également composé d'autres cellules gliales telle que la microglie (Jin *et al.*, 2013; Liu & Chopp, 2016). Cette cicatrice gliale forme une barrière entre les tissus nécrosés et le reste des tissus limitant la régénération des tissus nerveux en inhibant la repousse axonale. La microglie résidente est très rapidement activée (quelques minutes post-ischémie) par les substances libérées par les cellules nécrosées et les cytokines afin de jouer son rôle de phagocyte (*cf. Chapitre III, section, p.193*). Tout comme l'astroglie réactive et les leukocytes, la microglie activée sécrète des facteurs pro-inflammatoires et des ROS (Cherry *et al.*, 2014). L'activation de la microglie peut avoir un double effet, soit bénéfique soit délétère. En effet, ces cellules gliales peuvent jouer un rôle majeur dans la plasticité cérébrale. Cette particularité de la microglie sera abordée dans le

---

<sup>1</sup> Enzymes brisant les liaisons péptidiques des protéines.

<sup>2</sup> Leur rôle est multiple et essentiel dans l'homéostasie du SNC mature puisqu'ils assurent la protection des neurones, leur fonctionnement et la maintenance de l'équilibre ionique du milieu extracellulaire. Par ailleurs, ils sont à l'interface des neurones et des vaisseaux sanguins faisant l'intermédiaire entre ces deux types de cellules en transférant l'O<sub>2</sub> et les nutriments du sang vers les cellules nerveuses.

chapitre III car elle sera directement liée à l'étude n°3. L'inflammation post-ischémique est donc un phénomène complexe ne se limitant pas seulement à activer des mécanismes délétères pour les tissus nerveux dû à son action sur les mécanismes neuroprotecteurs (*cf. Chapitre III, section 1.1 - p193*).

### ***2.6 Les effets délétères de la reperfusion sanguine***

Paradoxalement, la reperfusion sanguine peut exacerber la lésion cérébrale en détériorant la *penumbra* (Nour *et al.*, 2012). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette altération. La réponse inflammatoire semble jouer un rôle critique en détruisant l'intégrité des cellules endothéliales et de la BHE. Par ailleurs, l'infiltration des leucocytes dans les tissus lésés induit une propagation de l'inflammation. Les ROS sont également fortement stimulés après la reperfusion facilitant la destruction cellulaire. Finalement, l'hyperperfusion post-ischémique peut être à l'origine d'un œdème vasogénique mais aussi d'hémorragie, liés à la fragilisation des vaisseaux sanguins suite aux lésions microvasculaires.

### ***2.7 Évolution de la cascade ischémique dans le temps***

La cascade ischémique est également un phénomène évolutif car la dégradation des tissus évolue rapidement dans le temps et dans l'espace suivant 3 phases. Durant la phase aiguë de l'ischémie, la conséquence directe est la défaillance énergétique accompagnée d'une dépolarisation membranaire excessive induisant des lésions cellulaires et la mort neuronale par nécrose dans les premières minutes suivant l'occlusion (1 à 2 minutes). La phase subaiguë est caractérisée par une expansion du cœur de l'ischémie vers la zone de la *penumbra* après 4 à 6 heures. Cette phase est liée à la propagation des dépolarisations et à différents mécanismes moléculaires de lésion cellulaire. Enfin, une phase plus tardive de dégradation tissulaire

intervient durant plusieurs semaines post-occlusion *via* l'inflammation, l'œdème vasogénique et l'apoptose (Figure 1.8) (Heiss, 2010).

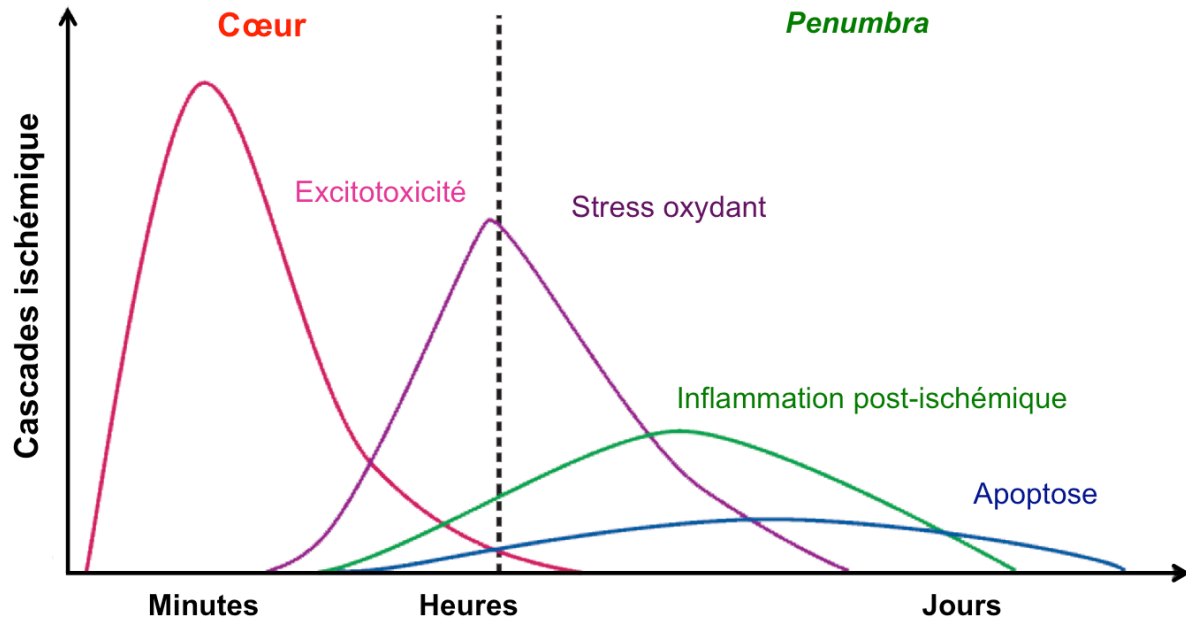


Figure 1.8 : Évolution spatio-temporelle de la cascade ischémique.

### 2.8 Le modèle animal dans la recherche sur l'AVC

La majorité des mécanismes détaillés ci-dessus ont été mis en évidence sur le modèle animal (Encadré 1.1) (Patejdl & K. Zettl, 2012). En effet, l'AVC est une pathologie multifactorielle présentant une grande hétérogénéité clinique interindividuelle. Cette forte variabilité entrave sévèrement la possibilité de dégager clairement les mécanismes neurophysiologiques principaux associées à l'AVC (Macrae, 1992; Durukan & Tatlisumak, 2007). Plusieurs modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale ont été développés sur le rongeur pour optimiser la reproductibilité des altérations physiologiques induites car il est possible de contrôler les variables influençant la sévérité de la lésion.

### Encadré 1.1 | Le modèle animal et l'ischémie cérébrale : quelle espèce choisir ?

Les cliniciens sont souvent dubitatifs sur les données issues des expérimentations sur le modèle animal en déclarant que l'animal est trop différent de l'Homme. Est-ce vraiment le cas ?

Le modèle animal a fourni la plupart des connaissances sur les mécanismes physiopathologiques et contribue à développer les traitements (Patejdl & K. Zettl, 2012 ; Smith et al, 2004). La palette d'espèces animales utilisée s'étend des plus petits rongeurs aux primates non-humains. De nos jours, la majorité des expérimentations sur l'AVC est effectuée sur le rongeur (Patejdl & K. Zettl, 2012). Les avantages sont d'une part éthiques et financiers et d'autre part, plusieurs caractéristiques physiopathologiques sont similaires à l'Homme (Durukan & Talisumak, 2007). En effet, les mécanismes moléculaires sous-jacents à la mort cellulaire sont reconnus comme étant proches entre la souris, le rat et l'Homme. La souris est plus appropriée pour subir des modifications génétiques et sont donc la plus utilisée en technologie transgénique. Le rat est relativement homogène d'un point de vue génétique permettant d'avoir une bonne reproductibilité des conséquences de la lésion. Le rat possède la capacité d'atteindre et d'attraper la nourriture avec une seule patte, permettant d'explorer les circuits neuronaux relatifs à l'habileté des mouvements fins (Durukan & Talisumak, 2007). Le système vasculaire cérébral du rat et son fonctionnement sont proches de celui de l'Homme (Yamori et al., 1976). En effet, le rat tout comme l'Homme présentent le cercle de Willis (anastomoses artérielles alimentant l'encéphale). Autre exemple, en bloquant la carotide interne, incluant l'artère hypothalamique, une hyperthermie se développe comme chez l'Homme (Wang-Fischer, 2009). La même procédure chez la souris ne cause pas d'hyperthermie. L'inconvénient le plus fréquemment relevé est que les traitements pharmacologiques considérés comme efficaces dans les études précliniques sur le rongeur se sont révélées inefficaces lors des essais cliniques (Patejdl & K. Zettl, 2012). De plus, la taille de la lésion est beaucoup plus importante que celle observée en clinique et les déficits moteurs sont moins importants car il n'y a pas d'hémiplégie chez le rat (seulement hémiparésie). Le primate non-humain reste l'espèce qui présente le plus de similarités avec l'Homme en ce qui concerne les études comportementales et l'intégration sensorimotrice en raison de son cerveau gyrencephalique. En effet, la réorganisation corticale post-ischémie chez le primate ainsi que les tâches d'habileté de la main sont celles qui se rapprochent le plus de celles que l'on retrouve chez l'Homme (Canazza et al, 2004).



La complexité des AVC humain n'est pas identique chez le rongeur où seulement certaines caractéristiques sont retrouvées (mort cellulaire et développement de la *penumbra*). On parle donc d'ischémie cérébrale chez le rongeur et non d'AVC. L'utilisation du rongeur présente les inconvénients suivants :

- les facteurs contribuant au déclenchement d'un AVC chez l'Homme (facteurs de comorbidité par exemple) ne sont pas pris en compte,
- l'ischémie cérébrale est réalisée sur des animaux jeunes pour optimiser le taux de survie. L'influence du vieillissement sur la récupération n'est donc pas prise en compte,
- les modèles d'AVC chez le rat occasionnent essentiellement des troubles fonctionnels au niveau du membre supérieur, avec de légers déficits du membre inférieur contrairement à

ce qu'il est observé chez les patients AVC (Kleim *et al.*, 2007). En effet, les différents modèles d'ischémies cérébrales n'entraînent jamais d'hémiplégie, seulement une hémiparésie.

- les différents modèles n'induisent pas les mêmes répercussions physiologiques au niveau cérébral (Encadré 1.2). Certains modèles engendrent des répercussions similaires à celles retrouvées chez l'Homme alors que d'autres en sont éloignés (Kudo *et al.*, 1982; Ren *et al.*, 2012; Demyanenko & Uzdensky, 2016). De plus, la taille de la lésion est souvent bien plus importante chez l'animal que ce que l'on retrouve chez les patients (40-45 % de l'hémisphère contre <15-20 % respectivement).

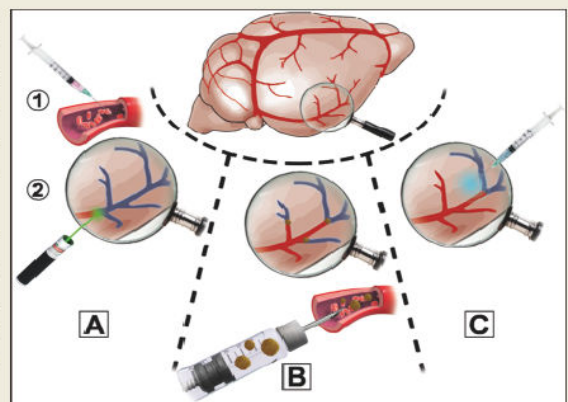
### Encadré 1.2 | Les différents modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale

Étant donné que l'ACM est la plus souvent touchée chez l'Homme, la grande majorité des modèles d'ischémie cérébrale chez le rat cible cette artère (Kleim *et al.*, 2007). Les répercussions physiologiques diffèrent entre les modèles qui présentent tous des avantages et des inconvénients. Nous retiendrons les méthodes chirurgicales les plus utilisées dans la littérature ne nécessitant pas de craniotomie (Braeuninger et Kleinschnitz, 2009).

« *Phototrombosis model* »: l'injection systémique d'un colorant photosensible (A.1; e.g. Rose Bengal) suivi d'une irradiation focale du crâne avec un faisceau lumineux (A.2) induit une lésion corticale. La génération de l'oxygène singulet entraîne des dommages endothéliaux focaux, l'activation et l'agrégation des plaquettes dans la zone irradiée. Cette procédure est peu invasive et permet d'obtenir une reproductibilité élevée de la lésion. L'expérimentateur peut choisir la localisation de la lésion *via* les coordonnées stéréotaxiques. Bien qu'il ait été indiqué qu'il n'y ait pas de *penumbra*, certains auteurs ont montré qu'il y en a bien une (Demyanenko & Uzdensky, 2016). Cette méthode s'avère appropriée pour des études précliniques.

« *Embolic cerebral ischemia* »: La procédure consiste à injecter un caillot de sang autologue dans l'ACI du rat anesthésié (B). La physiopathologie de l'ischémie est le principal avantage de cette procédure puisqu'elle est représentative des AVC humains. Cependant, elle provoque un taux de mortalité très élevé si la période d'ischémie est supérieure à 45 min. La variabilité de la lésion est importante car, selon la taille du caillot, celui-ci va se loger à différents endroits et provoquer une réduction des débits sanguins plus ou moins sévère. Elle provoque également dans 40% des cas, une hémorragie sous-arachnoïdienne (Ren *et al.*, 2012).

« *Endothelin-1 induced stroke* »: Cette méthode consiste à appliquer un puissant vasoconstricteur (ET-1) directement sur l'ACM exposée ou sur un segment adjacent à l'ACM par une injection intracérébrale (C). La physiopathologie de la lésion qui en découle est similaire à celle induit par la MCAo-r. Cette méthode est peu invasive et engendre une ischémie dans une zone préférentielle. En revanche, la sévérité et la durée de la lésion ne peuvent pas être bien maîtrisées étant donné l'action dose-dépendante de l'ET-1. Certaines études ont aussi montré que l'ET-1 peut interférer avec l'interprétation des stratégies de réparations neurales (Carmichael, 2005 ; Braeuninger & Kleinschnitz, 2009). Il est à noter qu'aucune de ces méthodes ne peut induire une paralysie d'un membre. L'hémiplégie ne peut donc pas être étudiée à ce jour avec le modèle animal.





### 3. Évaluation des déficits suite à une ischémie cérébrale chez le rat

#### 3.1 Mesures comportementales

L'utilisation d'une batterie de tests comportementaux précise et adaptée au modèle d'ischémie cérébrale utilisé permet de 1) contrôler la sévérité et la reproductibilité de la lésion (et donc la fiabilité du modèle d'ischémie cérébrale), 2) mesurer l'évolution des déficits et/ou la récupération spontanée sur une période donnée, et 3) évaluer les effets de la récupération comportementale suite à l'application d'une stratégie thérapeutique (Kleim *et al.*, 2007; Schaar *et al.*, 2010; de Vries *et al.*, 2011). Les tests de comportement présentent cependant des limites car ils reflètent les déficits de manière globale et peuvent être le reflet de mécanismes de compensation sans qu'il n'y ait de restauration de la fonction nerveuse altérée. Ils ne fournissent donc pas d'informations sur les mécanismes nerveux sous-tendant les altérations sensorimotrices. L'étude de ces mécanismes nécessite donc des analyses plus spécifiques (tels que l'électrophysiologie ou l'immunohistologie). Dans nos travaux, le terme de « récupération fonctionnelle » fait référence à l'amélioration des performances fonctionnelles sans déterminer son origine, c'est-à-dire, sans distinguer l'action des processus de compensation de ceux de réparation d'une fonction altérée (Levin *et al.*, 2008).

#### 3.1.1 Altérations sensorimotrices chez le rat

L'activité sensorimotrice reflète la réponse intégrée de l'action des informations sensorielles sur l'activité motrice. Il est donc parfois difficile de trouver des tests comportementaux qui dissocient et évaluent spécifiquement ces deux fonctions. Dans cette optique, il est préférable de combiner plusieurs tests étant donné que tous les déficits ne sont pas uniquement le reflet de l'altération d'une seule fonction (Erdö *et al.*, 2006; Kleim *et al.*, 2007; de Vries *et al.*, 2011). Globalement, une ischémie cérébrale unilatérale est associée à

des déficits aussi bien somatosensoriels que moteurs au niveau controlatéral, reflétant une hémiparésie (Erdő *et al.*, 2006; Schaar *et al.*, 2010; de Vries *et al.*, 2011). Nous allons présenter les principaux tests utilisés et les déficits associés (liste non-exhaustive). Les tests du *Rotarod*, de la poutre, du plan incliné et la mesure du score neurologique ont révélé des troubles de la coordination motrice, de l'équilibre et de l'endurance musculaire (Hunter *et al.*, 1998; Balkaya *et al.*, 2013). Le test de la force de préhension, mesurant indépendamment la force musculaire, a permis de renforcer l'idée que les animaux lésés présentent une faiblesse musculaire des pattes antérieures (Erdő *et al.*, 2006; Bhandari & Ansari, 2008; Deshmukh *et al.*, 2011). La capacité à atteindre une cible ainsi que la motricité fine semblent également fortement perturbées chez ces animaux. Le test du Staircase est un autre moyen simple et efficace pour quantifier l'habileté à atteindre une cible (nourriture) (Grabowski *et al.*, 1993; Hunter *et al.*, 1998). Pour le versant plus sensoriel, le test du ruban adhésif montre une forte perturbation de la sensibilité du côté controlatéral à la lésion, mais également des déficits légers du côté ipsilatéral (Freret *et al.*, 2006). Lors de ce même test, il est possible d'observer une asymétrie sensorielle appelée héminégligence ou extinction tactile. Cela fait référence à un manque d'attention de l'animal face à un stimulus tactile appliqué simultanément du côté ipsi- et controlatéral à la lésion (Schallert *et al.*, 1982; Schallert, 2006).

Le test de suspension par la queue révèle une flexion de la patte antérieure rabattue vers l'abdomen du côté controlatéral à l'hémisphère touché, alors que chez un animal sain, la patte est en extension. De plus, l'animal se redresse exclusivement du côté hémiparétique illustrant une asymétrie de la lésion c'est-à-dire un comportement moteur différent d'un côté par rapport à l'autre (Borlongan *et al.*, 1998). Cette asymétrie est fréquemment mis en évidence par le test des vibrisses (Hunter *et al.*, 1998). Lors de ce test, l'expérimentateur stimule les vibrisses du rat en les frottant ce qui a pour effet de provoquer une réponse

motrice de la patte ipsilatérale aux vibrisses stimulées. Chez les animaux lésés, cette réponse est diminuée du côté controlatéral à la lésion.

### 3.1.2 Controverses sur les atteintes sensorimotrices

Certains tests méritent plus d'attention afin de mieux caractériser les déficits sensorimoteurs (Aronowski *et al.*, 1996; Zausinger *et al.*, 2000; de Vries *et al.*, 2011). Il n'existe pas de test précis mesurant les troubles de l'équilibre et les adaptations posturales chez le rat, alors que ces dernières sont fréquemment perturbées chez l'Homme (Pérennou & Bronstein, 2005; De Nunzio *et al.*, 2014). De plus, ces déficits sont fortement impliqués dans les risques de chutes durant la marche et dans la perte d'autonomie des patients (Batchelor *et al.*, 2012).

Le test d'équilibre statique sur une poutre reste à améliorer car il ne permet pas systématiquement de détecter les modifications vestibulomotrices induites par une ischémie cérébrale. En effet, les animaux peuvent reposer l'abdomen sur la poutre sans utiliser leurs pattes ce qui fausse la mesure de l'équilibre. Par ailleurs, l'évaluation de la force de préhension devrait être complétée. En effet, la force des deux pattes séparément n'est jamais mesurée. De ce fait, lorsque la force est mesurée avec les 2 pattes simultanément, une perturbation de la force de préhension du côté lésé pourrait être masquée par une éventuelle compensation apportée par la patte non-lésée (Erdő *et al.*, 2006; Bhandari & Ansari, 2008; Akhtar *et al.*, 2008; Deshmukh *et al.*, 2011). De plus, la diminution de la force de préhension reste controversée puisqu'une étude n'a pas décelé de modification de la force de préhension (Akhtar *et al.*, 2008). Les tests de comportements effectués dans la 1<sup>ère</sup> étude de ce manuscrit seront réalisés de manière à clarifier ses points controversés.

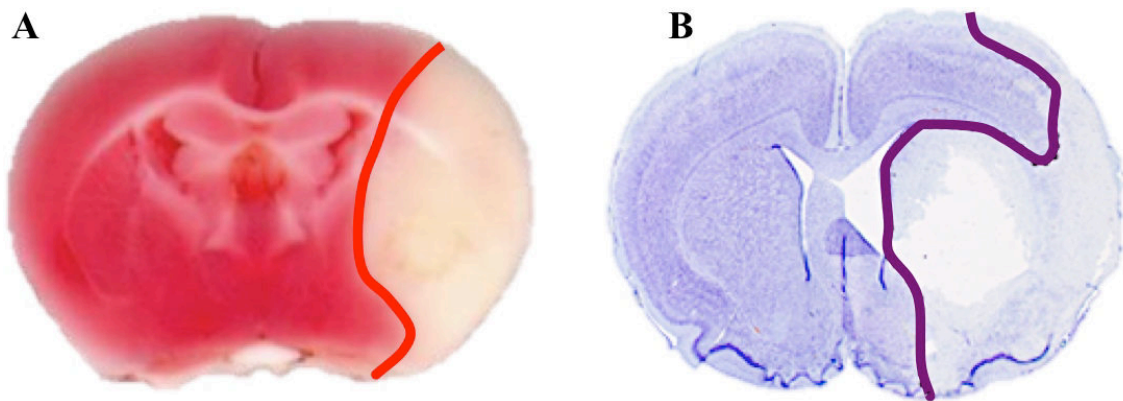
### 3.2 Analyse histologique : le volume lésionnel

Dans les études expérimentales sur l'AVC, l'évaluation des déficits post-ischémique est fréquemment couplée à une analyse histologique. L'analyse histologique est indispensable pour 1) s'assurer de la fiabilité de la chirurgie, 2) évaluer les régions cérébrales touchées et 3) vérifier la reproductibilité de la lésion d'un animal à un autre. L'analyse histologique permet aussi d'analyser l'influence des traitements neuroprotecteurs visant à diminuer le volume lésionnel, facteur associé à une amélioration de la récupération fonctionnelle (Gupta & Briyal, 2004; Durukan & Tatlisumak, 2007).

L'étendue de la lésion ainsi que les structures cérébrales affectées par la lésion ischémique déterminent la nature des déficits fonctionnels. Cependant, le volume lésionnel n'est pas le seul facteur expliquant l'évolution des déficits et/ou de la récupération fonctionnelle. Il est parfois observé une amélioration de la performance aux tests comportementaux sans pour autant observer une régression du volume lésionnel. En effet, il n'est pas systématiquement observé de corrélation entre ces deux paramètres après l'ischémie cérébrale (Wahl *et al.*, 1992; van der Staay *et al.*, 1996; Hunter *et al.*, 1998; Cenci *et al.*, 2002; Durukan & Tatlisumak, 2007). Ceci est confirmé chez l'Homme avec l'utilisation de la tomographie (*i.e.* technique d'imagerie médicale permettant de reconstruire le volume d'une lésion) où aucune corrélation n'est trouvée entre la taille/localisation de la lésion et les déficits fonctionnels (Dromerick & Reding, 1995; Pantano *et al.*, 1996).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette constatation à commencer par les méthodes d'histologie chez l'animal. Ces dernières ne sont pas standardisées (*i.e.* différents protocoles pour un même colorant ou différentes méthodes de coloration) et difficilement comparables d'une étude à une autre. Le chlorure de triphenyltetrazolium (TTC) et le crésyl

violet (CV) sont des méthodes d'analyses histologiques communément utilisées (**Figure 1.9**). Globalement, le TTC colore en rouge les tissus métaboliques actifs (marqueur d'enzymes mitochondriales telles que les déshydrogénases) et en blanc les tissus nécrosés (*Bederson et al., 1986; Benedek et al., 2006*). Or, certains tissus sont marqués en blanc alors qu'ils ne présentent pas de lésion irréversible mais seulement une dysfonction mitochondriale transitoire. Pour cette raison, le TTC n'est pas le meilleur indicateur pour quantifier le volume lésionnel de l'infarctus puisqu'il a tendance à surestimer l'étendue de la zone lésée et ne peut être utilisé que sur une courte période. Cependant, il représente malgré tout une méthode assez fiable et peu coûteuse permettant d'obtenir une mesure quasi-immédiate (environ 1h) (*Türeyen et al., 2004; Benedek et al., 2006*). Le CV permet de situer les zones lésées et de quantifier le volume lésionnel en marquant en pourpre les corps de Nissl situés dans les réticulumms endoplasmiques rugueux et les ribosomes, eux-mêmes présents dans le corps cellulaire et les dendrites des neurones (*Alvarez-Buylla et al., 1990*). Le CV représente aussi un moyen d'évaluer la perte neuronale en mesurant le nombre de neurones après une lésion ou d'étudier l'état structurel des neurones (*e.g.* dissolution du corps de Nissl). Cette technique constitue une des méthodes histologiques les plus reproductibles pour mesurer l'effet d'une lésion ischémique sur le tissu cérébral sur du long terme mais est relativement chronophage.



**Figure 1.9 :** Exemple d'une coupe de cerveau de rat marqué au TTC (A) et au CV (B) après une ischémie cérébrale [Adaptée (*Popp et al., 2009*)].

Par ailleurs, les techniques utilisées en histologie sont limitées à une analyse structurelle des tissus cérébraux (*i.e.* estimation du volume lésionnel et/ou quantification du nombre résiduel de neurones) et ne permettent pas de détecter les modifications fonctionnelles des réseaux neuronaux. Or, certaines cellules sont structurellement intactes mais avec une activité fonctionnelle altérée (comme dans la *penumbra* par exemple), expliquant donc partiellement qu'il n'y ait pas systématiquement de lien entre taille de la lésion et déficits fonctionnels. Cependant, l'évaluation de la taille de la lésion reste tout de même importante afin d'exclure/inclure l'influence de ce paramètre sur les déficits et/ou la récupération sensorimotrice.

En conclusion de cette sous-partie, les différentes sources de ces déficits restent à déterminer puisque la taille de la lésion ne coïncide pas toujours avec les déficits observés. Il semble donc que les répercussions de la zone infarctée sur le reste du système nerveux central (SNC ; encéphale et moelle épinière) joue également un rôle important pour expliquer les déficits observés.

### **4. Réorganisation du système nerveux central après une ischémie cérébrale**

#### ***4.1 Concept de neuroplasticité***

Comme détaillé précédemment, l'étendue des zones cérébrales touchées par l'ischémie n'explique pas complètement les déficits observés et leur progression dans le temps (Wahl *et al.*, 1992; Hunter *et al.*, 1998; Cenci *et al.*, 2002; Durukan & Tatlisumak, 2007). Que ce soit chez l'Homme ou l'animal, il est maintenant acquis que le SNC possède la faculté de remodeler ses circuits neuronaux en modifiant la structure et l'activité fonctionnelle des cellules qui les composent. Cette capacité, appelée « neuroplasticité », désigne donc l'ensemble des processus fonctionnels et structurels sous-tendant la réorganisation du SNC et

intervient en réponse à des stimulations intrinsèques ou extrinsèques (Cramer *et al.*, 2011). Ainsi cette réorganisation est active, entre autres, en réponse à des atteintes du SNC. Les processus de neuroplasticité sont multiples et interdépendants et se déroulent à plusieurs échelles, du niveau moléculaire et cellulaire au niveau comportemental. Précisément, ils englobent les mécanismes de transformations morphologiques des neurones, les modifications des connexions neuronales incluant la plasticité synaptique (*e.g.* synaptogénèse), la génération de nouveaux neurones (*i.e.* neurogenèse) et les modifications neurobiochimiques (*e.g.* libération de facteurs neurotrophiques). Cette plasticité est adaptative lorsque les processus sont associés avec une amélioration des fonctions nerveuses ou maladaptative lorsque ses processus induisent des conséquences néfastes sur le SNC (Cohen *et al.*, 1997; Nudo, 2006).

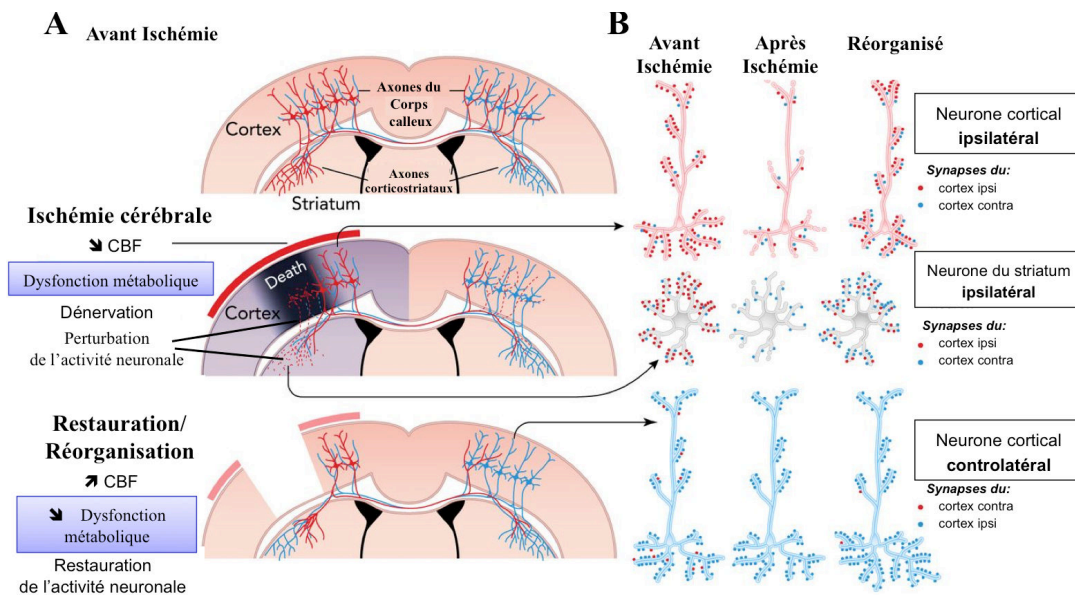
Cette plasticité post-AVC survient notamment dans l'hémisphère ipsilésionnel (l'hémisphère affecté) incluant la *penumbra*, mais aussi dans l'hémisphère controlésionnel. Il semble également que la lésion influence la régulation des fonctions motrices jusqu'au niveau de la moelle épinière.

### ***4.2 Plasticité cérébrale et spinale post-AVC***

Les mécanismes de neuroplasticité suite à un AVC favorisent la récupération fonctionnelle spontanée en renforçant par exemple l'activité des voies épargnées par l'ischémie et/ou en créant de nouvelles connexions synaptiques et/ou en stimulant la neurogenèse et la croissance axonale (Jones & Adkins, 2015). Les adaptations cérébrales au niveau de l'hémisphère ipsilésionnel contribuent à la récupération fonctionnelle. Dans la phase aigüe post-ischémique, la résorption de l'œdème cérébral et la reperfusion sanguine de la *penumbra* favorisent les premiers signes de récupération spontanée (Hallett, 2001; Teasell

*et al.*, 2005). De plus, la régression du *diaschisis*<sup>1</sup> pourrait également être à l'origine de la récupération spontanée de certaines fonctions (*Teasell et al.*, 2005).

L'évolution de la *penumbra* joue un rôle particulièrement important. L'altération des tissus déclenche les mécanismes de régénération en augmentant la libération des facteurs neurotrophiques (*cf. Chapitre III, section 1.2 - p.200*) favorisant la survie et la prolifération cellulaire et en diminuant les molécules inhibitrices de la croissance neuronale (*Jones & Adkins, 2015*). Ces observations sont confirmées par des études sur le modèle animal montrant des modifications structurelles intervenant dans cette zone (*i.e.* bourgeonnements axonaux, remodelage dendritique et synaptogenèse) (*Jones & Adkins, 2015*). La récupération spontanée passe également par une ré-innervation des zones affectées à partir de nouvelles collatérales d'axones, formant donc de nouvelles synapses, originaires de l'hémisphère controlatéral, induisant une réorganisation des circuits neuronaux (**Figure 1.10**).



**Figure 1.10 : Mécanismes spécifiques à la récupération spontanée après l'ischémie cérébrale et impliquée dans la récupération fonctionnelle.** On peut voir que de nouvelles synapses se forment sur les neurones de la *penumbra* à partir de collatérales d'axones en provenance du cortex ipsi- et controlatéral (*Jones & Adkins, 2015*). Nous pouvons voir que les cellules nerveuses sous corticales du côté lésé reçoivent essentiellement des connexions provenant du cortex non-lésé alors qu'en situation normale, les projections sont essentiellement ipsilatéral. Les neurones du cortex controlatéral ne reçoivent quasiment plus de projections originaires de la zone du cortex lésé.

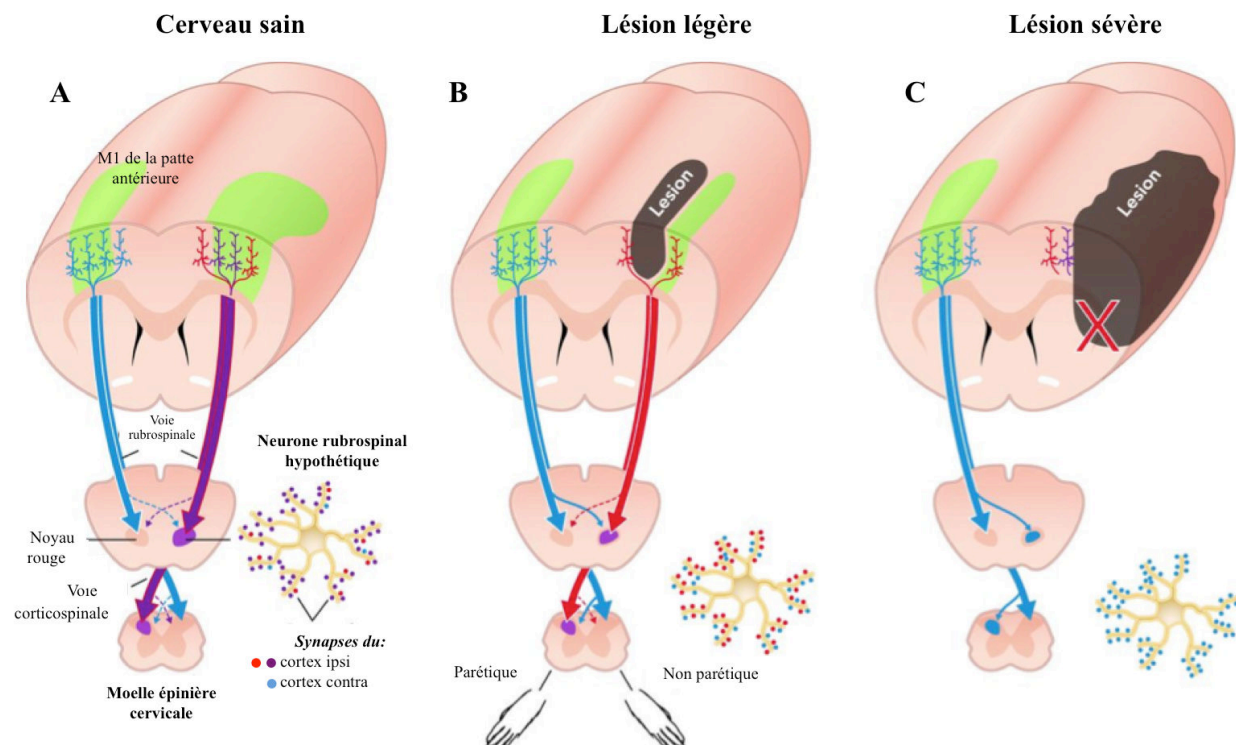
<sup>1</sup> Introduit par Von Monakow en 1914, le *diaschisis* fait référence à une interruption soudaine des connexions nerveuses entre des zones cérébrales environnantes ou éloignées du site lésionnel initial et les neurones situés dans le cœur ischémique, expliquant certains déficits sensorimoteurs. Le *diaschisis* apparaît rapidement après le traumatisme cérébral provoquant alors une perte, temporaire et réversible, de la fonction des régions distantes connectées (*Carrera & Tononi, 2014*).



D'un point de vue clinique, les patients dont l'activité cérébrale est augmentée dans la *penumbra* du cortex moteur présentent une meilleure récupération fonctionnelle (Hallett, 2001; Teasell *et al.*, 2005). De plus, la récupération fonctionnelle au niveau musculaire est concomitante à un élargissement et/ou une délocalisation des aires motrices corticales au niveau de l'hémisphère lésé, indiquant l'importance des mécanismes de plasticité dans cette région (Hallett, 2001; Teasell *et al.*, 2005; Murphy & Corbett, 2009; Cramer *et al.*, 2011).

L'AVC induit une interruption des connexions entre les voies descendantes corticales affectées et les zones de projections telles que le tronc cérébral ou la moelle épinière. Ainsi, l'action des neurones impliqués dans la commande motrice allant du cortex à la moelle épinière est perturbée. Les zones sous-corticales et les zones spinales vont alors être ré-innervées par des bourgeonnements axonaux originaires des voies descendantes corticales épargnées (**Figure 1.11**). Ainsi, Starkey *et al.* (2012) ont montré que les projections corticospinales de la région nerveuse des membres postérieurs, qui aboutissent normalement au niveau lombaire, ré-innervent la zone cervicale après une lésion du cortex moteur spécifique aux membres antérieures (Starkey *et al.*, 2012). D'autres auteurs ont démontré que les deux hémisphères contribuent à la réinnervation de la moelle épinière après une ischémie cérébrale chez la souris (Liu *et al.*, 2009). L'implication des voies descendantes controlésionnelles est d'autant plus prédominante lorsque les voies ipsilésionnelles sont fortement atteintes (Hallett, 2001; Biernaskie *et al.*, 2005). Ces mécanismes de plasticité sont susceptibles de modifier l'activation musculaire car la fonction du membre parétique est dépendante de la réorganisation des aires somatosensorielles et motrices (Carmel & Martin, 2014). Ainsi, il semble peu probable que les centres supraspinaux contribuent seuls à l'ensemble des mécanismes impliqués dans la réorganisation du système moteur post-AVC. Dans la suite de ce chapitre, nous verrons que les voies motrices spinales, c'est-à-dire les

réflexes somatiques<sup>1</sup>, sont modulées suite à une atteinte cérébrale.



**Figure 1.11 : Réorganisation neuroanatomique après lésion corticale chez le rat.** *A*) Projections des voies corticospinales et rubrospinales de l'aire motrice (M1) de la patte antérieure d'un cerveau intact. *B*) et *C*) En fonction de la sévérité de la lésion ischémique, la réinnervation des zones sous-corticales et de la moelle épinière est liée à des projections originaires des neurones épargnés du cortex ipsilatéral (neurones restant et/ou environnants la lésion) mais aussi provenant du cortex moteur primaire controlésionnel. Nous pouvons observer en *B* et *C* le rôle des collatérales des fibres descendantes controlésionnelles au niveau des zones sous-corticales et de la moelle épinière. *C*) Après une lésion sévère, la voie controlésionnelle assure la majorité des projections vers le côté lésé (membre atteint). [adaptée de (Jones & Adkins, 2015)].

Les études précliniques continuent de se focaliser essentiellement sur les sites cérébraux entourant la zone touchée alors qu'il est admis que la moelle épinière est également un centre d'intégration fondamental des informations sensorimotrices. De plus, cette zone du SNC, pourtant éloignée de la zone directement touchée par l'ischémie, subit également des altérations à la suite de l'AVC (Block *et al.*, 2005). Étant donné que la régulation de l'activité motrice au niveau spinal est un aspect important du contrôle moteur (Encadré 1.3), l'étude

<sup>1</sup> Voies réflexes qui impliquent les neurones somatomoteurs et les muscles squelettiques. Ce type de réflexe est observé dans la moelle épinière. Ceux sont donc des réflexes dits spinaux. On parle fréquemment de réflexes d'étirement ou myotatique.

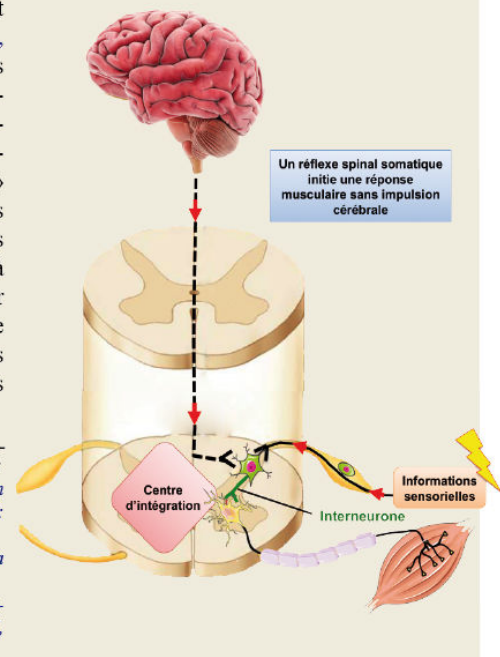
des mécanismes de plasticité de la boucle sensorimotrice<sup>1</sup> suite à un AVC au niveau de la moelle épinière permet d'affiner la compréhension de la physiopathologie (Misiaszek & Pearson, 1997; Zehr, 2002; Knikou, 2008).

Ce type de boucle sensorimotrice est fréquemment étudié à partir de l'activité des voies des réflexes somatiques spinaux (réflexe myotatique). Le paramètre le plus utilisé pour étudier la plasticité de la boucle sensorimotrice au niveau spinal est le réflexe de Hoffman (ou réflexe-H).

### Encadré 1.3 | La moelle épinière : un centre d'intégration sensorimoteur

De nos jours, la moelle épinière n'est plus simplement considérée comme une structure permettant de relayer les influx nerveux entre les centres supraspinaux et le système nerveux périphérique. Il est maintenant acquis que la moelle épinière est un centre d'intégration des informations nerveuses à part entière. Sa capacité à générer des schémas locomoteurs (« *center pattern generator* » : CPG) sans modulation à partir des voies supraspinales ou des retours sensoriels l'atteste parfaitement (Hooper, 2001; Hultborn & Nielsen, 2007). Néanmoins, ces derniers stimulent et/ou modulent l'activité locomotrice. Le réflexe myotatique illustre également cette capacité à utiliser les informations sensorielles pour déclencher une action motrice et la réguler.

Le rôle de la moelle épinière dans la gestion de la commande motrice est tout aussi essentiel que celui des centres nerveux supraspinaux (Nielsen, 2004). En effet, les informations en provenance des voies corticospinales / extra-corticospinales et des afférences articulaires, cutanées et musculaires peuvent converger au niveau de la moelle épinière sur des interneurons communs afin de faciliter ou d'inhiber le recrutement motoneuronal. D'après Nielsen, il semble incorrect de dissocier le « réflexe spinal » (réflexe somatique) et le « mouvement volontaire ». Selon lui, il serait plus juste de se questionner sur comment les retours sensoriels, à travers des voies spécifiques d'interneurones spinaux, contribuent à activer ou à inhiber l'activité musculaire lors d'un mouvement (Nielsen, 2004). Par ailleurs, les différents mécanismes d'intégration au niveau de la moelle épinière ne sont pas figés, et peuvent être modifiés dans des conditions physiopathologiques ou suite à un entraînement physique, expliquant les altérations neuromusculaires et/ou amélioration de la performance.



#### Références

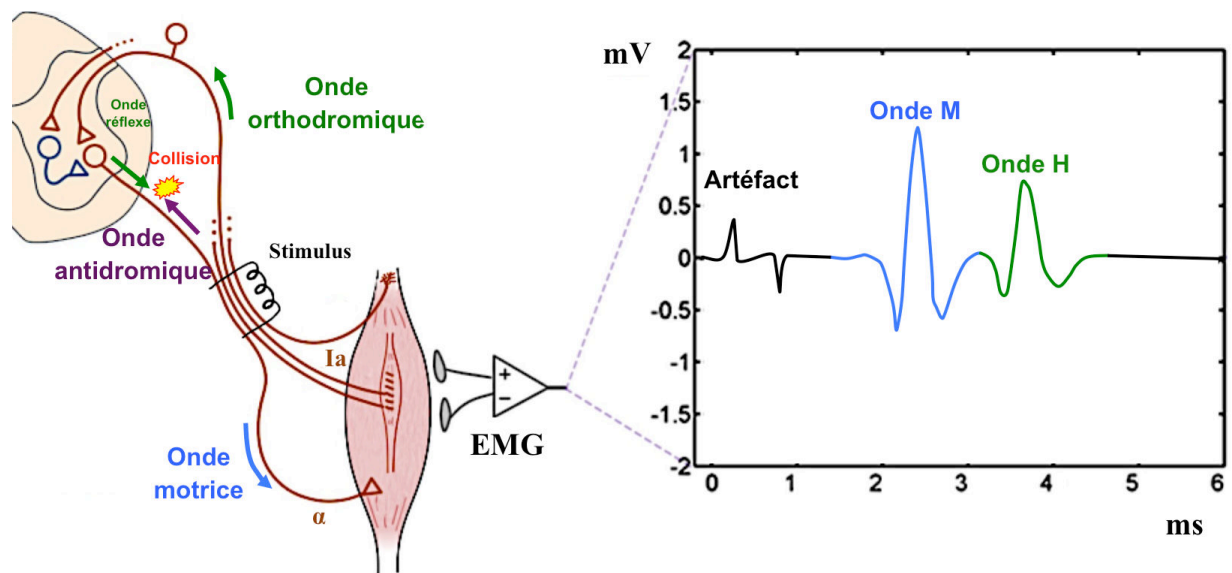
- Hooper SL (2001). *Central Pattern Generators*. In *Encyclopedia of Life Sciences*, ed. John Wiley & Sons, Ltd. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0000032> [Accessed January 5, 2017].
- Hultborn H & Nielsen JB (2007). *Spinal control of locomotion? from cat to man*. *Acta Physiol* 189, 111–121.
- Nielsen JB (2004). *Sensorimotor integration at spinal level as a basis for muscle coordination during voluntary movement in humans*. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985 96, 1961–1967.

<sup>1</sup> La boucle sensorimotrice (en fait, les boucles sensorimotrices) n'a pas la même définition selon les domaines en neurosciences et ne fait donc pas référence aux mêmes mécanismes nerveux. Il semble donc important de mentionner que la boucle sensorimotrice fait référence dans ce manuscrit à l'action excitatrice et/ou inhibitrice des informations afférentes, originaires essentiellement des muscles et des tendons, sur le recrutement des unités motrices (Didier, 2004).

#### 4.2.1 Le réflexe de Hoffman : un outil d'exploration de la plasticité neuromusculaire au niveau spinal

Cette méthode est communément utilisée en électrophysiologie pour évaluer la plasticité de la boucle sensorimotrice au niveau de la moelle épinière en réponse à diverses conditions telles qu'une pathologie, un exercice physique, un traitement pharmacologique ou encore lors de l'activité locomotrice (Misiaszek & Pearson, 1997; Zehr, 2002; Knikou, 2008).

Le réflexe-H est un réflexe évoqué électriquement par la stimulation du nerf du muscle d'intérêt (Figure 1.12). Il reflète l'efficacité de la transmission synaptique au niveau spinal entre les afférences de gros diamètres (essentiellement les afférences des groupes Ia) et les motoneurones- $\alpha$  innervant un même muscle. En d'autres termes, il estime la quantité d'unités motrices recrutées (activation motoneuronale) à partir de l'activation des afférences musculaires, donc par voie réflexe.



**Figure 1.12 : Mécanisme du réflexe-H.** La stimulation électrique du nerf recrute à la fois les fibres afférentes, préférentiellement de gros diamètre (Ia), et les motoneurones- $\alpha$ . Le signal électrique est recueilli sur le muscle par les électrodes EMG. D'une part, le courant se propage du site de la stimulation vers le muscle: c'est l'onde motrice directe (ou onde M). Au cours de cette même stimulation, une onde orthodromique est également générée au niveau des afférences et se propage jusqu'au niveau synaptique. L'influx nerveux est alors transmis des afférences Ia aux motoneurones- $\alpha$  induisant une onde motrice réflexe (ou onde H). Cependant, une onde antidromique est générée en parallèle au niveau des motoneurones et rentre en collision avec l'onde H limitant l'amplitude de l'onde H. L'amplitude du réflexe-H permet donc d'étudier la plasticité de la boucle sensorimotrice en évaluant l'efficacité de la transmission du signal entre les afférences Ia et les motoneurones- $\alpha$ .

Les afférences fusoriales de type Ia, lorsqu'elles sont stimulées, exercent une action excitatrice sur les motoneurones- $\alpha$  du même muscle. Ainsi l'activation des afférences fusoriales contribue à la production de force volontaire. En effet, il a été montré que le blocage de la réponse des afférences fusoriales induit une diminution de la production de force maximale volontaire (Macefield et al., 1991, 1993). Leur action est modulée au niveau spinal par différents mécanismes (facilitateurs ou inhibiteurs) pré- et post-synaptiques (**Encadré 1.4**). Durant le mouvement, ces derniers font référence aux propriétés intrinsèques du motoneurone- $\alpha$ , à l'action des voies motrices descendantes et à l'action des différents types d'afférences musculaires, tendineuses et articulaires des muscles homonymes et/ou hétéronymes (Knikou, 2008).

## Encadré 1.4 | Les mécanismes de régulation du réflexe-H

### 1) Mécanisme de dépression post-activation

Ce phénomène reflète une diminution de la libération de neurotransmetteurs dans la synapse entre les afférences fusoriales du type Ia et les motoneurones- $\alpha$  du muscle homonyme induisant une baisse de l'activation motoneuronale (Pierrot-Deseilligny & Mazevet, 2000). Ce mécanisme apparaît également après la décharge prolongée des afférence Ia en réponse à l'étirement du muscle étudié induit par la contraction du muscle antagoniste (Crone & Nielsen, 1989; Hultborn *et al.*, 1996). D'un point de vue clinique, une diminution de ce mécanisme peut indiquer une spasticité chez des patients présentant des lésions spinales et supraspinales (Grey *et al.*, 2008).

### 2) Inhibition pré-synaptique des afférences Ia

*Inhibition D1.* Ces mécanismes d'inhibition sont considérés comme les principaux mécanismes inhibiteurs du réflexe-H. Ce mécanisme fait référence à une diminution de l'amplitude des potentiels excitateurs post-synaptique (PPSE) sans changements notables de l'excitabilité intrinsèque du motoneurone- $\alpha$  du muscle homonyme. L'inhibition pré-synaptique peut provenir des afférences de gros diamètre de muscles antagonistes (Pierrot-Deseilligny & Mazevet, 2000; Knikou, 2008).

*Afférences des groupes III et IV.* Le rôle de ces afférences sera détaillé au cours des 2 premiers chapitres. Mentionnons simplement que ces afférences musculaires peuvent induire une inhibition de l'activité réflexe en situation de fatigue induite par un exercice physique exhaustif.

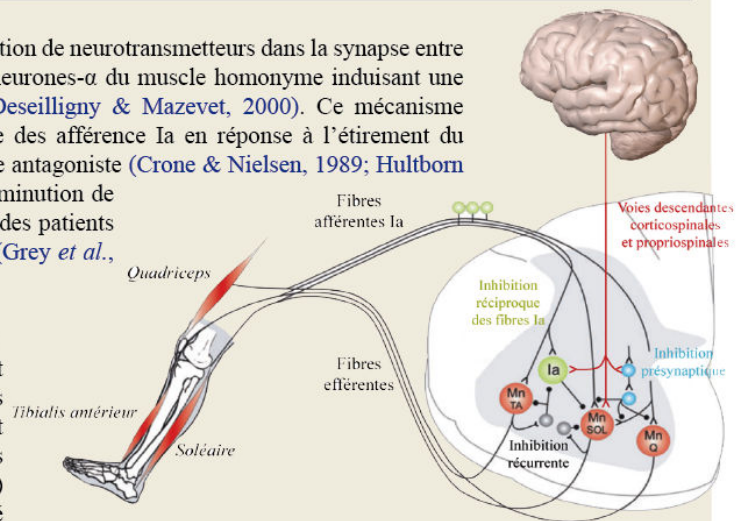
### 3) Mécanismes d'inhibition post-synaptique

*Inhibition réciproque des afférences Ia sur les motoneurones- $\alpha$  antagonistes.* L'activation des afférences Ia induite par la contraction musculaire a pour effet d'inhiber l'activité motoneuronale des muscles antagonistes *via* un interneurone inhibiteur agissant directement au niveau post-synaptique (Eccles & Lundberg, 1959).

*Inhibition non-réciproque des afférences Ib.* Les afférences Ib joue également un rôle inhibiteur au niveau du muscle homonyme car, lorsqu'elles sont activées, une diminution du réflexe-H est observée, sans affecter les composants pré-synaptiques de la boucle réflexe (Knikou, 2008).

*Inhibition récurrente.* L'activation des cellules de Renshaw provoque une inhibition de l'excitabilité des motoneurones- $\alpha$  (Hultborn & Pierrot-Deseilligny, 1979). Cette inhibition peut être observée à l'état de repos et au cours de légères contractions musculaires. En revanche, l'inhibition récurrente diminue lorsque la production de force est élevée, suggérant un rôle non-négligeable dans le contrôle des mouvements volontaires.

*Rôle des voies descendantes.* Les voies corticospinales sont également connues pour réguler l'amplitude de l'onde H. Une stimulation électrique transcrânienne du cortex moteur peut inhiber la décharge des motoneurones- $\alpha$  en facilitant plusieurs mécanismes d'inhibition tels que l'inhibition réciproque des afférences Ia et les mécanismes d'inhibition D1 (Iles & Pisini, 1992). Si l'intensité de la stimulation magnétique transcrânienne est importante, le réflexe-H peut être, à l'inverse, facilité (Meunier & Pierrot-Deseilligny, 1998).



## 4.2.2 Perturbation de la régulation des réflexes somatiques post-AVC

Plusieurs études chez le patient AVC ont déjà mis en évidence une altération de la régulation des réflexes somatiques à partir de la mesure du réflexe-H dans diverses conditions comme le repos, la locomotion, l'analyse posturale ou l'étude de la spasticité (Hwang *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2007; Schindler-Ivens *et al.*, 2008; Fuchs *et al.*, 2011; Phadke *et al.*, 2012; Cho & Lee, 2013; Stowe *et al.*, 2013; Motta-Oishi *et al.*, 2013; Liang & Brown, 2015). Ces études présentent des résultats contradictoires. Ainsi, Phadke *et al.* (2012) montrent que l'amplitude du réflexe-H (au repos) est augmenté chez des patients AVC chroniques

comparés aux sujets contrôles suggérant une hyperactivité motoneuronale au niveau du membre supérieur parétique (Phadke *et al.*, 2012). Cette hyperactivité motoneuronale compenserait l'incapacité des voies supraspinales à activer les motoneurones suite à la lésion cérébrale. À l'inverse, Stowe *et al.* (2013) n'observent aucune différence dans l'amplitude du réflexe-H au niveau des membres supérieurs chez des sujets AVC comparés à chez des sujets contrôles (Stowe *et al.*, 2013). Ces divergences peuvent être expliquées par le fait que, dans l'étude de Stowe *et al.* (2013) le nombre de sujet serait trop faible pour observer un effet statistiquement significatif.

L'activité réflexe contribue à l'activité locomotrice (Capaday & Stein, 1986; Crenna & Frigo, 1987; Koceja *et al.*, 1995; Goulart *et al.*, 2000). Chez le sujet sain, l'amplitude du réflexe-H varie en fonction des différentes phases de la marche pour être à son maximum durant le milieu de la phase d'appui et à son minimum lors de la phase d'envol (Cho & Lee, 2013). À l'inverse, chez les sujets AVC, il a été rapporté que l'amplitude du réflexe-H est minimum lors du contact talon-sol, donc pendant la phase d'appui (Cho & Lee, 2013). Dans cette même étude, l'amplitude du réflexe-H est toujours plus élevée chez le patient AVC que chez le sujet sain quelque soit la phase de la marche. Au cours des différentes phases de pédalage (flexion/extension), il est indiqué l'amplitude du réflexe-H des sujets AVC est toujours supérieure à celles des sujets contrôles. De plus, cette amplitude ne varie pas quelque soit la phase de pédalage contrairement à celle des sujets contrôles. (Schindler-Ivens *et al.*, 2008; Fuchs *et al.*, 2011). Ceci suggère que la régulation réflexe au niveau du membre inférieur parétique semble donc perturbée au cours de l'activité locomotrice et du cycle de pédalage (Hwang *et al.*, 2004; Schindler-Ivens *et al.*, 2008; Fuchs *et al.*, 2011; Cho & Lee, 2013; Liang & Brown, 2015).

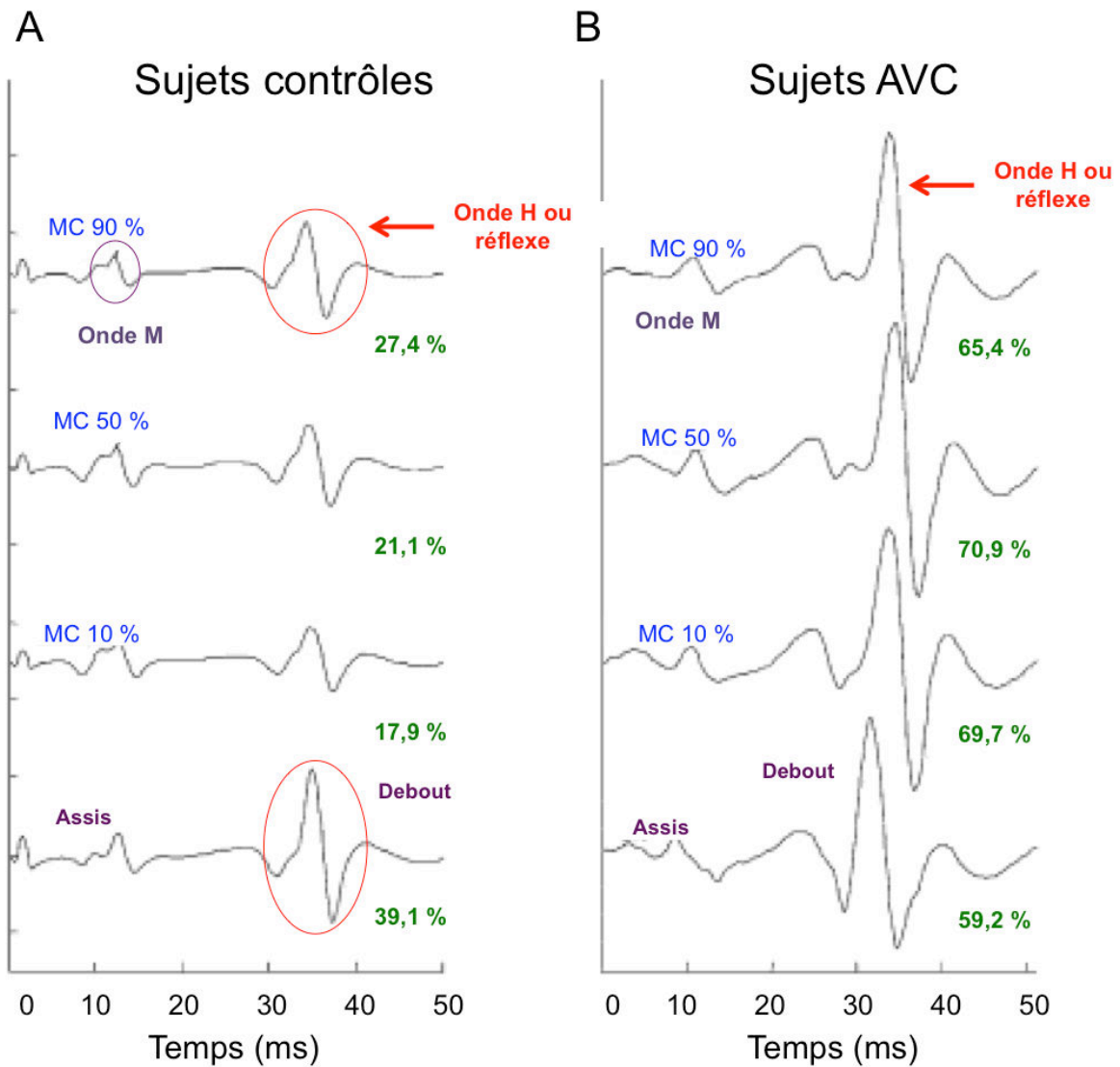
Dans les études posturales, chez le patient AVC, il n'est pas observé d'influence de la posture (assis/debout) sur la modulation de l'activité réflexe durant une tâche de pédalage et l'amplitude du réflexe-H est diminuée avec l'augmentation de la charge de travail chez les patients AVC (Liang & Brown, 2015). À l'inverse, chez les sujets sains, ce réflexe varie en fonction des différents états posturaux et augmente avec la charge de travail. Les auteurs postulent que ces mécanismes pourraient être en partie responsables de l'incapacité des sujets AVC de supporter leur charge posturale. Ainsi, l'augmentation du support du poids corporel n'influence pas la réponse du réflexe-H sur le *triceps surae* chez les sujets hémiparétiques, contrairement aux sujets contrôles (Figure 1.13). Il est suggéré dans cette étude que les interneurons inhibiteurs<sup>1</sup> des afférences Ia, normalement posture-dépendant, ne sont plus facilités par les voies supraspinales. Par ailleurs, l'amplitude du réflexe-H au niveau du *triceps surae* ne varie pas chez les sujets AVC durant la phase de redressement (de la position assise à debout) alors qu'elle diminue chez les sujets sains (Hwang *et al.*, 2004). En complément, un autre exemple illustrant le rôle des mécanismes spinaux dans la régulation de l'activité motrice post-AVC est celui de la spasticité<sup>2</sup> (Nielsen *et al.*, 2007; Lamy *et al.*, 2008; Motta-Oishi *et al.*, 2013).

---

<sup>1</sup> Neurone multipolaire qui établit de multiples connexions entre un réseau afférent et un réseau efférent.

<sup>2</sup> Activation excessive et incontrôlée des motoneurons via la voie réflexe induisant une hypertonie et hyper-réflexivité musculaire.





**Figure 1.13 :** Exemple de réponses du réflexe-H en fonction de différents pourcentages de support du poids corporel (10, 50 et 90 % en bleus) sur le triceps surae et de différentes postures (en violet). L'amplitude du réflexe-H (valeurs en verts) est représentée en pourcentage de l'onde M (onde reflétant l'excitabilité membranaire du muscle) maximale obtenue avant (A) l'onde H. L'onde H typiquement diminuée chez les sujets contrôles et (B) chez les sujets hémiparétiques, faiblement diminuée. [adaptés de (Hwang *et al.*, 2004)]. MC : masse corporelle.

Chez le patient AVC, l'amplitude du réflexe-H est plus élevée au niveau des muscles du membre inférieur du côté parétique (*soleus* et *vastus medialis*) lors d'une contraction isométrique comparé aux sujets sains (Schindler-Ivens *et al.*, 2008). Les auteurs postulent que l'hyperactivité des motoneurones innervant les muscles parétiques pourrait être liée à une diminution des mécanismes d'inhibition au niveau spinal afin de compenser les déficits d'activation des voies supraspinales (Hwang *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2007; Dyer *et al.*, 2009; Motta-Oishi *et al.*, 2013).

Cependant, ces mécanismes d'inhibition des réflexes somatiques dans le cadre de l'ischémie cérébrale n'ont toujours pas été étudiés. Or, les mécanismes d'inhibition des unités motrices jouent un rôle majeur dans le contrôle du mouvement car pour pouvoir réguler l'activité motrice, il est impératif qu'il y ait un équilibre entre les informations excitatrices et inhibitrices des motoneurones. Si l'intégration des informations excitatrices et/ou inhibitrices au niveau de la commande motrice est perturbée, la production de force, la précision et/ou la coordination du geste en question seront affectés. L'atteinte des voies de régulation de l'activité motrice serait également observée en situation de fatigue. En effet, l'exercice physique intense, connu pour atténuer l'amplitude des réflexes, pourrait être un cadre expérimental intéressant pour mettre à l'épreuve la régulation des voies réflexes chez des animaux ayant subi une ischémie cérébrale.

### **4.2.3 Le rôle de la fatigue induite par l'exercice physique dans la régulation de l'activité réflexe : Effet de l'ischémie cérébrale ?**

L'exercice physique induisant une fatigue peut être considéré comme un outil de diagnostic pour déceler une dysfonction potentielle qui serait masquée dans des conditions physiologiques de repos (*i.e.* activité musculaire minimum). L'exercice physique intense est associé à un retour sensoriel qui va jouer un rôle important en stimulant des mécanismes de plasticité au niveau de la moelle épinière, en provoquant *in fine* une baisse de l'amplitude du réflexe. Ces informations sensorielles sont caractérisées par l'activation des afférences mécanosensibles d'origine musculaires, tendineuses ou articulaires (afférences des groupes I et II), mais aussi par l'implication des afférences metabosensibles (afférences du groupe III, qui sont aussi mécanosensibles, et du groupe IV) (Bigland-Ritchie *et al.*, 1986; Garland & McComas, 1990). Au cours d'un exercice fatigant, l'accumulation de produits métaboliques stimule les afférences musculaires metabosensibles pendant, mais aussi, après l'exercice

(Gandevia, 2001). En effet, il a été suggéré chez des animaux sains que ces afférences exercent un rétrocontrôle au niveau spinal et supraspinal, induisant une inhibition des réflexes somatiques au cours et après une fatigue induite électriquement (Pettorossi *et al.*, 1999; Kalezic *et al.*, 2004). Ces résultats sont confirmés chez le sujet sain où il a fréquemment été montré qu'une fatigue isométrique, qu'elle soit volontaire ou induite électriquement, provoque une baisse du réflexe-H (Garland & McComas, 1990; Duchateau & Hainaut, 1993; Duchateau *et al.*, 2002; Walton *et al.*, 2002). L'exercice musculaire fatigant pourrait donc déceler des dysfonctions potentielles au niveau des mécanismes d'inhibition de la boucle sensorimotrice, décrite plus haut.

Par ailleurs, plusieurs auteurs suggèrent que l'action des afférences metabosensibles permettrait de limiter une fatigue prématurée en informant le SNC des modifications métaboliques. Elles contribueraient donc à élaborer la réponse motrice la plus adaptée à l'état métabolique du muscle mais également d'éviter une altération excessive de la structure musculaire (théorie du « *muscle wisdom* ») (Bigland-Ritchie & Woods, 1984; Bigland-Ritchie *et al.*, 1986; Amann *et al.*, 2011). Par exemple, la performance lors d'une épreuve de temps limite est diminuée chez les rats dont les afférences metabosensibles ont été détruites *via* l'injection de capsaïcine. Dans la même étude, il est observé une baisse supérieure de la production de force après 3 min de stimulation électrique musculaire par rapport aux animaux contrôles (Dousset *et al.*, 2004). La contribution de ces afférences à la performance physique est confirmée par une étude menée chez l'Homme où lorsque les récepteurs des afférences metabosensibles sont bloqués par l'injection d'un antagoniste (le fentanyl), la performance sur un temps limite (80 % de la puissance maximale) est diminuée de 21 % et semble associée à

une fatigue périphérique importante (réduction du twitch<sup>1</sup> de 44 % au niveau du quadriceps) (Amann *et al.*, 2011).

Cependant, les conditions expérimentales des études sur le patient AVC décrites dans les paragraphes précédents ont été élaborées pour éviter l'influence de la fatigue sur la régulation de l'activité réflexe (*cf. Chapitre I, section 4.2.2 - p.44*). Ainsi, les influences des mécanismes de régulation des réflexes associés à une fatigue musculaire<sup>2</sup> ne sont pas encore définies suite à une ischémie cérébrale. Néanmoins, une fatigue précoce lors d'un exercice a déjà été observée chez le patient AVC (Monga *et al.*, 1988). Cette apparition plus précoce des signes de fatigue est la conséquence du déconditionnement cardiovasculaire et musculaire observé post-AVC. En revanche à notre connaissance, aucune donnée expérimentale n'indique que la régulation des voies réflexes soit perturbée au cours et après un travail musculaire fatigant. De façon plus générale, la fatigue induite par l'exercice durant la phase aigüe de l'AVC n'a jamais été caractérisée. Ceci peut être lié au fait que les exercices musculaires fatigants peuvent être douloureux/désagréables pour les patients et ne sont donc pas réalisés pour des raisons éthiques au cours de la période aigüe. En revanche, ce type d'expérimentation peut être mené sur l'animal anesthésié ayant subi une ischémie cérébrale. Une fatigue musculaire peut être évoquée électriquement sur un muscle cible. De plus, des mesures de l'activité des réflexes somatiques avant et après l'exercice évalueraient l'impact de la contraction musculaire prolongée sur l'activité réflexe. Une modification de la régulation des réflexes permettrait de supposer quels sont les mécanismes potentiellement responsables de ces changements.

---

<sup>1</sup> Secousse musculaire élémentaire induite par une stimulation électrique unique sur un nerf périphérique. La réponse mécanique à cette stimulation est enregistrée.

<sup>2</sup> Réduction de la capacité du muscle à produire une force ou une puissance durant un exercice, que la tâche puisse être maintenue ou non (Bigland-Ritchie & Woods, 1984; Sogaard *et al.*, 2006). Cette définition fait bien la différence entre la fatigue musculaire et la capacité à continuer une tâche physique. En effet, la fatigue musculaire ne représente ni le moment précis où la tâche s'arrête ni un épuisement du muscle. La fatigue musculaire intervient dès lors qu'une diminution de la force ou de la puissance maximale se produit. Elle peut être reflétée par une réduction de la force musculaire, une modification de l'activité électromyographique ou une altération de la fonction contractile. Elle se développe donc progressivement dès le début d'un exercice intense.

Dans notre cadre expérimental, l'exercice isométrique fatigant pourrait dégager une éventuelle perturbation de l'activité motrice au niveau de la moelle épinière et ainsi apporter de nouvelles informations sur la physiopathologie de ce traumatisme.

En résumé, les déficits sensorimoteurs observés post-AVC ne semblent donc pas uniquement liés à l'étendue et à la localisation de la lésion ainsi qu'à la plasticité cérébrale. Les régulations spinales de la commande motrice peuvent aussi expliquer les déficits sensorimoteurs mais elles sont à ce jour mal connues. L'influence des afférences musculaires sur les réflexes somatiques n'a pas encore été prise en compte. Cet aspect peut être étudié dans un premier temps à partir d'une fatigue induite par un exercice isométrique, connu pour stimuler les mécanismes inhibiteurs du recrutement des unités motrices à partir des voies réflexes (Adreani *et al.*, 1997). Ainsi, à partir d'un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat, nous allons tenter de mettre en avant une éventuelle perturbation des mécanismes d'inhibition des réflexes somatiques avant et après un exercice isométrique fatigant au cours de la phase aiguë post-ischémique, tout en s'assurant de la reproductibilité de la lésion à partir de plusieurs outils méthodologiques.

## 5. Étude n°1

### Adaptations neuromusculaires induites par un exercice physique suite à une ischémie cérébrale chez le rat

- A new method to assess weight-bearing distribution after central nervous system lesions in rats. Behavioral Brain Research. 259, 78–84. doi: 10.1016/j.bbr.2013.10.043. (2014).

\*PIN-BARRE, C., \*PERTICI, V., FELIX, M.-S., LAURIN, J., BRISSWALTER, J., DERCHERCHI, P. \*Vincent Pertici et Caroline Pin-Barre sont considérés comme 2 premiers auteurs de l'article. Ils ont contribué de manière similaire pour cette étude.

- Acute Neuromuscular Adaptation at the Spinal Level Following Middle Cerebral Artery Occlusion-Reperfusion in the Rat. PLoS ONE. 9, e89953. doi: 10.1371/journal.pone.0089953. (2014).

PIN-BARRE, C., LAURIN, J., FELIX, M.-S., PERTICI, V., MARQUESTE, T., KOBER, F., MATARAZZO, V., MUSCATELLI-BOSSY, F., TEMPREADO, J.-J., BRISSWALTER, J., DERCHERCHI, P. (IF 2014: 3,73).

#### 5.1 Objectif de l'étude n°1

L'objectif de la première étude de ce travail de thèse est d'approfondir chez le rat, les répercussions d'une ischémie cérébrale sur la régulation des réflexes somatiques au cours de la 1<sup>ère</sup> semaine post-lésionnelle chez le rat. En effet, durant la phase aigüe post-ischémique, l'étendue de la zone infarctée évolue très vite. Les déficits cérébraux et le score neurologique semblent à leur maximum un jour post-lésion ([Yang et al., 2003](#)). Ajoutons que 24 h post-ischémique est une période de choix pour initier un traitement (pharmacologique ou rééducation fonctionnelle) ce qui sera approfondi plus tard dans ce manuscrit ([Lee et al., 2009](#); [Yang et al., 2012](#)). Par la suite, l'importance de la lésion cérébrale a tendance à se stabiliser à partir de 7 jours ([Virley et al., 2000](#); [Matsuda et al., 2011](#)). C'est donc au cours de cette période que nous avons évalué 1) les déficits sensorimoteurs à partir de tests comportementaux pour répondre aux controverses existantes et apporter de nouvelles caractéristiques des déficits post-ischémiques, 2) les adaptations sensorimotrices au niveau spinal en mesurant la réponse du réflexe-H du *triceps brachii* avant et après un exercice

isométrique fatiguant, connu pour induire une accumulation de métabolites pendant et après la contraction musculaire et 3) l'étendue de la lésion cérébrale.

L'hypothèse de cette étude est que l'inhibition du réflexe somatique du côté parétique pourrait être atténuée après un exercice isométrique chez des animaux ayant subi une ischémie cérébrale reflétant ainsi une perturbation de la régulation motrice au niveau spinal.

### ***5.2 Matériels & méthodes de l'étude n°1***

#### **5.2.1 Animaux**

Trente six rats mâles Sprague-Dawley (Charles River, Les Oncins, France) ont été conservés dans cette étude sur un total de 50 rats. Tous les animaux sont placés dans une cage individuelle en respectant un cycle lumière/obscurité de 12 heures avec nourriture et eau *ad libitum*. La température de la pièce est maintenue à 22 °C. Aucun signe d'hyperactivité, d'anorexie et de prostration n'est observé au cours des différentes phases du protocole. Le poids des animaux est également contrôlé quotidiennement. Ce protocole a été validé par le comité d'éthique local d'Aix-Marseille Université et du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

#### **5.2.2 Protocole expérimental**

Les animaux sont répartis aléatoirement dans les 5 groupes expérimentaux suivant :

- 1) Témoins (n=8) avec des animaux naïfs de toute chirurgie.
- 2) MCAo-J1 (n=8) avec des animaux ayant subi l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (ACM) et dont les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés 1 jour après la lésion.

3) MCAo-J7 (n=8) avec des animaux ayant subi l'occlusion de l'ACM et dont les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés 7 jours après la lésion.

4) SHAM-J1 (n=6) avec des animaux ayant subi la chirurgie sans l'ischémie cérébrale et dont les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés 1 jour après la chirurgie.

5) SHAM-J7 (n=6) avec des animaux ayant subi la chirurgie sans ischémie cérébrale et dont les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés 7 jours après l'opération.

### *Déroulement du protocole*

Chez des animaux éveillés, il est réalisé :

1) la familiarisation des animaux avec les tests comportementaux [sauf pour le test de distribution pondérale (DWB) et le score neurologique] à raison de 3 jours par semaine pendant deux semaines. Les valeurs de référence (PRE) sont ensuite enregistrées pour chacun des tests.

2) l'évaluation de la récupération fonctionnelle à partir de la batterie de 6 tests comportementaux complémentaires au jour 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7 post-ischémique (J1, J2, J3, J4, J5, J6, J7).

Sur des animaux anesthésiés, il est réalisé :

1) la chirurgie pour induire l'occlusion de l'ACM pour les groupes MCAo et cette même chirurgie mais sans occlusion pour les groupes SHAM.

2) les enregistrements électrophysiologiques : à J1 pour les groupes MCAo-J1 et SHAM-J1 et à J7 pour les groupes MCAo-J7 et SHAM-J7.

3) la mesure de l'œdème cérébral à J1 et à J7 par imagerie par résonance magnétique (IRM) ou le prélèvement de l'encéphale à la fin de l'expérimentation afin de pouvoir effectuer l'analyse histologique de la taille de la lésion cérébrale.



### 5.2.3 Induction d'une ischémie cérébrale : Présentation du modèle de la « middle cerebral artery occlusion reperfusion » - la MCAo-r

Dans le cadre des travaux de cette thèse, nous avons utilisé cette méthode au niveau proximal (Longa *et al.*, 1989; Uluç *et al.*, 2011). Elle permet d'induire une ischémie unilatérale au niveau du cortex somatosensoriel et du striatum dorsolatéral (noyaux caudé et putamen par l'occlusion de l'ACM, en introduisant un monofilament dans l'artère carotide commune (ACC) (Corbett & Nurse, 1998). Avec ce modèle, l'expérimentateur peut choisir de provoquer une ischémie permanente ou transitoire. Plus la durée de l'ischémie augmente et plus les dommages cérébraux peuvent s'étendre et atteindre le cortex frontal, pariétal, temporal et occipital mais aussi les structures sous-corticales tels que l'hypothalamus, le thalamus et la substance noire (Carmichael, 2005; Kleim *et al.*, 2007). Même si le cortex moteur n'est pas affecté, le striatum dorsolatéral est impliqué dans le traitement et l'intégration des informations sensorimotrices (Whishaw *et al.*, 1986; Pisa, 1988).

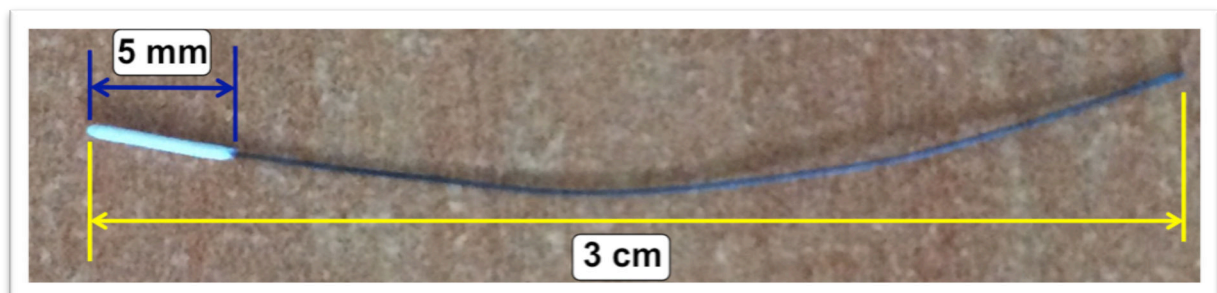
La MCAo-r reste la méthode la plus fréquemment utilisée dans les études sur l'AVC car elle présente les avantages suivants :

- Les effets de l'ischémie sur les tissus cérébraux ainsi que ceux de la reperfusion sanguine (après retrait du monofilament) induisent une physiopathologie représentative de ce qui est retrouvé chez l'Homme.
- Cette chirurgie est considérée comme peu invasive car elle ne requière pas de craniotomie et permet d'obtenir une lésion reproductible à condition de contrôler minutieusement les paramètres influençant la sévérité de la lésion (*i.e.* durée de l'ischémie, anesthésique, température corporelle, poids, âge, genre de l'animal, choix du monofilament) (Durukan & Tatlisumak, 2007).
- Cette méthode permet de tester les stratégies de neuroprotection puisque la lésion qui en découle est assez large avec une *penumbra* ischémique.

Elle présente aussi des inconvénients car la MCAo-r peut engendrer 1) une rupture de vaisseaux sanguins accompagnés d'hémorragies sous-arachnoïdiennes, 2) une hyperthermie (ischémie de 2 heures et au-delà) pouvant provoquer la mort de l'animal dans les 24 h post-ischémique, 3) un taux de mortalité assez élevé, 4) une occlusion inadéquate si les paramètres expérimentaux ne sont pas bien contrôlés. De plus, cette méthode n'induit pas de paralysie totale, mais seulement une parésie, puisqu'elle n'affecte pas directement le cortex moteur.

### *Paramètres de la procédure chirurgicale*

L'occlusion cérébrale est induite au niveau de l'hémisphère droit pour tous les animaux à partir de la MCAo-r (Uluç *et al.*, 2011). Pour cette technique, l'occlusion de l'ACM est réalisée à l'aide d'un monofilament (Docol Corp®, Redlands, USA) dont la pointe est recouverte de silicone (longueur totale : 3 cm ; longueur et diamètre de la pointe en silicone : 5 mm et 0,39 mm respectivement) (Figure 1.14). Pour réduire au maximum la variabilité de la taille de la lésion et optimiser sa reproductibilité d'un animal à un autre, la souche de rat, le poids, l'âge, le sexe, la température corporelle et la durée de l'ischémie sont des paramètres scrupuleusement surveillés (Wang-Fischer, 2009). Les chirurgies sont réalisées sur des animaux pesant entre 250 et 270 g. Si le poids dépasse les limites fixées, l'animal est exclu de l'étude.



**Figure 1.14** : Monofilament utilisé (Docol Corp®, Redlands, USA). La pointe en silicone (en blanc) est plus épaisse que le reste (en noir) du monofilament afin de bloquer la circulation sanguine seulement à ce niveau.

### *Étapes de la chirurgie*

1) Avant de commencer l'opération chirurgicale, les animaux sont rasés au niveau du cou puis la peau est désinfectée avec un antiseptique (Alcool et Bétadine<sup>®</sup> dermique 10 %, Meda Pharma, Paris, France). Les rats sont alors anesthésiés par voie gazeuse avec de l'isoflurane (Anestéo<sup>®</sup> induction 4 % et maintien entre 2 et 2,5 %). Ces derniers sont alors déposés dans la boîte à induction pendant  $\approx$  5 min. Durant la phase de maintien, l'anesthésique est diffusé à travers un masque alors que les animaux sont placés en décubitus dorsal sur un tapis chauffant permettant de maintenir leur température corporelle à 37 °C, contrôlée par un moniteur (*Harvard Homeothermic Blanket Control Unit*, K01345CE). Une dose de 0,2 ml de 0,5 % de bupivacaïne est administrée en sous-cutanée au niveau de la zone à inciser.

2) Une incision de 4 cm est réalisée dans l'alignement de la trachée. Les artères carotides commune (ACC), externe (ACE), et interne (ACI) du côté droit sont exposées en dégageant les tissus environnants tout en évitant d'endommager le nerf vague ainsi que ses collatérales (**Figure 1.15**).

3) Par la suite, les artères occipitale (AO) et thyroïde supérieure (ATS) sont sectionnées à l'aide d'un cautérisateur électrique (*Bovi Medical Cooperation Cleawater*, FL 33760, Etats-Unis) afin d'éviter tout saignement au cours des étapes suivantes de la chirurgie. L'ACC, l'ACE et l'ACI sont clampées pour isoler la zone où va être inséré le monofilament. Cette zone contient la bifurcation entre ACE et ACI.

4) Une hémisection de l'ACE au niveau rostral de l'AO est effectuée à l'aide de micro-ciseaux (**Figure 1.15.A**).

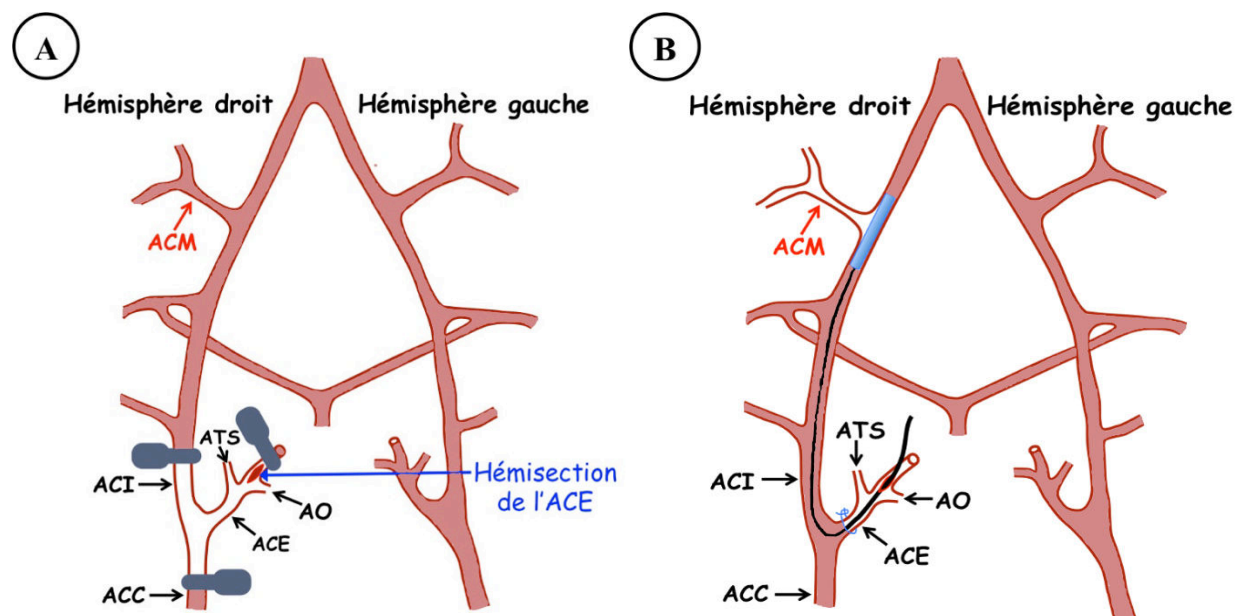
5) Un monofilament est alors introduit dans l'ACE jusqu'au clamp de l'ACC puis dirigé dans l'ACI (en faisant un demi-tour) jusqu'à la bifurcation avec l'ACM (**Figure 1.15.B**). Le monofilament est alors inséré sur 2 cm environ. L'ACM est bien bloquée lorsque

la partie visible du monofilament dépasse de 1 cm (mesurée à l'aide d'une règle). Si la longueur visible du monofilament est supérieure ou inférieure à 1 cm, le monofilament est retiré puis réinséré jusqu'à atteindre 1 cm de longueur visible. Les débits sanguins sont alors bloqués au niveau de l'ACM. Le monofilament est ensuite fermement fixé par un fil de suture au niveau de son insertion dans l'ACE. La durée de l'ischémie est fixée à 120 min car il a été montré qu'une ischémie comprise entre 90 et 120 min assurait une reproductibilité optimale du volume lésionnel et des déficits fonctionnels importants (Durukan & Tatlisumak, 2007).

6) Une fois les 120 min écoulées, le monofilament est enfin retiré délicatement tout en s'assurant qu'il n'y ait pas d'hémorragie.

7) L'ACE est ensuite cautérisée pour éviter tout risque d'hémorragie et la peau est suturée avant de remettre les animaux dans leur cage individuelle.

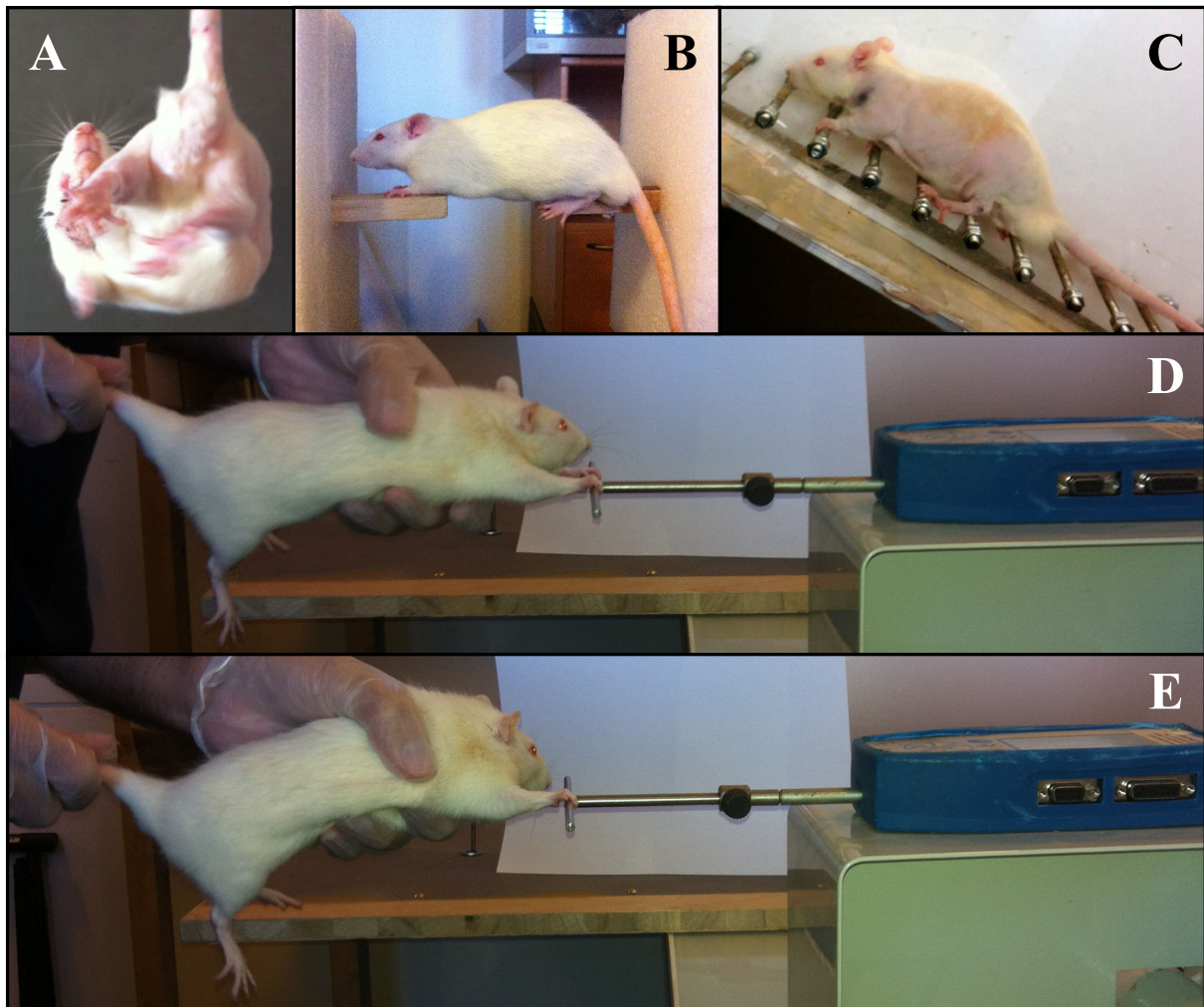
*N.B : Il est à noter que les animaux SHAM subissent exactement le même protocole sauf que les étapes 4 et 5 ne sont pas réalisées.*



**Figure 1.15 : Étapes majeures de la méthode MCAo-r. A)** L'ACC, l'ACE et l'ACI du côté droit sont clampées. L'AO et l'ATS sont cautérisées. Une hémisection est ensuite réalisée au niveau de l'ACE. **B)** Le monofilament est inséré dans l'ACE puis dirigé vers l'ACI. Il est ensuite poussé jusqu'à ce que sa pointe en silicone bloque le flux sanguin vers l'ACM. Il est ensuite retiré après 120 min d'occlusion (Adaptée de (Uluç et al., 2011)).

#### 5.2.4 Analyse comportementale : évaluation de la récupération fonctionnelle

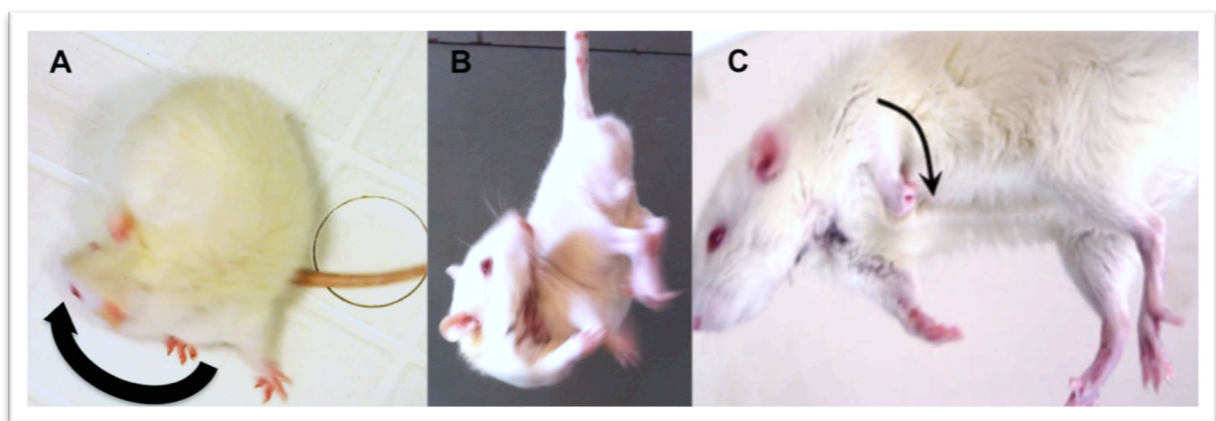
Chaque animal est soumis à une batterie de 6 tests comportementaux complémentaires afin d'évaluer l'impact de la lésion cérébrale sur leurs capacités sensorimotrices et la récupération fonctionnelle spontanée sur une période de 7 jours (**Figure 1.16**).



**Figure 1.16:** Quatre des 6 tests comportementaux utilisés dans l'étude n°1. A) Test de suspension par la queue, B) Test de l'équilibre statique sur une poutre, C) Test de l'échelle, D) Test de force de préhension de la patte antérieure droite et E) de la patte antérieure gauche.

### *Score neurologique : vérification de la sévérité de la lésion*

Plusieurs signes neurologiques peuvent indiquer la sévérité des déficits induits après les 120 min d'ischémie cérébrale durant les 24 h (**Figure 1.17**). Au-delà de ces 24 h, les animaux ont tendance à récupérer rapidement un score neurologique normal. Ainsi, ces signes permettent surtout de vérifier d'une part qu'il y a bien eu une lésion entraînant des déficits sensorimoteurs et d'autre part que la sévérité des déficits est reproductible d'un animal à un autre. Les animaux ne présentant pas ces signes neurologiques sont exclus de l'étude. Une lésion au niveau de l'ACM droite entraîne une parésie de l'hémicorps gauche. Ainsi lors de leurs déplacements, les animaux ont tendance à tourner dans la même direction et se redressent exclusivement sur la gauche lorsqu'ils sont maintenus par la queue (**Figure 1.17.A et B**). De plus, ces animaux montrent une flexion de la patte lésée contre le buste avec les doigts fléchis (**Figure 1.17.C**). Bien que ces signes soient analysés de manière subjective, ils permettent une évaluation assez fiable et rapide de la sévérité de la lésion. Le score est défini sur une échelle allant de 0 à 4 : 0 = aucun déficit apparent ; 1 = flexion de la patte gauche (parétique) ; 2 = retrait de la patte (flexion) lorsque l'animal est suspendu par la queue ; 3 = rotation du côté parétique lorsque l'animal est stimulé par une pression sur la queue ; 4 = rotation spontanée vers la gauche ([Menzies et al., 1992](#)).



**Figure 1.17** : Signes neurologiques consécutifs à l'ischémie cérébrale. Durant les 24 h post-ischémique cérébrale, les animaux tournent sur eux-mêmes (A), se redressent exclusivement sur la gauche (B) et montrent une extension de la patte antérieure contre le buste avec les doigts courbés (C).

### *Test de suspension par la queue*

Le test de la suspension par la queue mesure la latéralisation du comportement moteur, mettent en évidence une altération du côté droit (**Figure 1.16.A**). L'animal est suspendu en position verticale alors que l'expérimentateur le maintient par la queue. Instinctivement, ce dernier va se redresser soit vers la gauche soit vers la droite. Le rat est reposé dans sa cage entre chaque essai. La direction des redressements est notée sur les 10 essais réalisés. L'essai est considéré comme valide lorsque l'animal se redresse au-delà de 10° par rapport à l'axe vertical (Borlongan & Sanberg, 1995). Le nombre de redressement vers la gauche est normalisé par rapport au nombre de redressement total. Par exemple, si l'animal s'est redressé 7 fois à gauche et 3 fois à droite, le score est de 7/10 (nombre redressement G/nombre redressement total = 0,7).

### *Test de l'équilibre statique*

Le test d'équilibre statique est effectué pour évaluer la fonction vestibulomotrice globale (Zausinger *et al.*, 2000) (**Figure 1.16.B**). Nous l'avons modifié par rapport au test existant (Aronowski *et al.*, 1996). En effet, les pattes antérieures de l'animal sont posées sur une poutre étroite (28 mm de large) tandis que les pattes postérieures s'appuient sur une deuxième poutre de même dimension au lieu d'utiliser une poutre continue (afin que les animaux ne puissent pas reposer l'abdomen). Ces deux poutres sont alignées et séparées par un espace de 5 cm. L'animal ne peut donc pas maintenir son équilibre sans d'autres appuis que ses 4 pattes. Le temps d'équilibre statique de l'animal est mesuré avec une durée d'enregistrement maximale fixée à 60 secondes. Deux essais par animal sont effectués. Si l'animal tombe, le temps est arrêté. Le temps réalisé lors de chacune des 2 séries est alors additionné.

### *Test de l'échelle inclinée*

Le test de l'échelle est utilisé pour évaluer la capacité de l'animal à cibler et saisir les barreaux d'une échelle inclinée à 45° en la montant le plus rapidement possible (**Figure 1.16.C**) (Metz & Whishaw, 2009). Le score de réussite consiste à calculer le nombre de fois où l'animal attrape un barreau avec sa patte antérieure gauche lorsque ce dernier grimpe l'échelle (**Figure 1.18**). Si l'animal attrape fermement le barreau avec sa patte gauche, il obtient 2 points. Si l'animal rate le barreau avec sa patte gauche, aucun point ne lui est attribué. Si la patte touche le barreau mais glisse dessus ou ne le saisit pas complètement, le score obtenu est de 1 point. De même, si la patte frotte contre les barreaux au cours du mouvement (c'est-à-dire s'il ne peut pas bien lever sa patte), l'animal n'obtient qu'1 point, même s'il attrape correctement le barreau d'appui. Le score de réussite est normalisé par le nombre de pas total (minimum 20 pas). Ce rapport représente le taux de réussite. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport aux valeurs pré-opératoires (PRE). Durant le test, l'animal est filmé (Canon®, MV 830i, Courbevoie, France) pendant qu'il grimpe l'échelle. Les vidéos sont ensuite analysées par le logiciel SimiMotion (SimiMotion® *software*, Simi®, Unterschleissheim, Allemagne).



**Figure 1.18** : Les différentes positions de la patte antérieure gauche pouvant être obtenues au cours de la montée de l'échelle. Chaque position est associée à un score allant de 0 à 2.



### *Test de la force de préhension des pattes antérieures*

Afin d'évaluer l'activité motrice, la force de préhension des pattes antérieures de l'animal est mesurée à l'aide d'un appareil de force (*Grip Strength Tester bio-GT3, Bioseb® apparatus*, Vitrolles, France) (**Figure 1.16D et E**). L'expérimentateur tient l'animal par la base de la queue au-dessus de la barre de traction. Les animaux agrippent instinctivement la barre avec les 2 pattes et l'expérimentateur maintient le corps de l'animal horizontalement. L'expérimentateur tire sur la queue de l'animal dans l'axe du capteur de force (horizontalement) jusqu'à ce que les 2 pattes de l'animal lâchent la barre. Ainsi, la force de préhension maximale est obtenue juste avant que les pattes ne décrochent. Vingt essais sont réalisés et les 4 meilleures valeurs sont conservées puis moyennées. Les résultats de la force sont exprimés en gramme (g).

La force exercée par chaque patte est également évaluée indépendamment. La procédure est la même que pour la mesure de force des 2 pattes antérieures, excepté que l'expérimentateur maintient la patte non-évaluée hors de portée de la barre de traction. Vingt essais par patte sont réalisés et les 4 valeurs les plus élevées de chaque patte (exprimés en g) sont conservées puis moyennées. Enfin, le rapport force patte antérieure gauche / force patte antérieure droite (rapport G/D) est ensuite calculé.

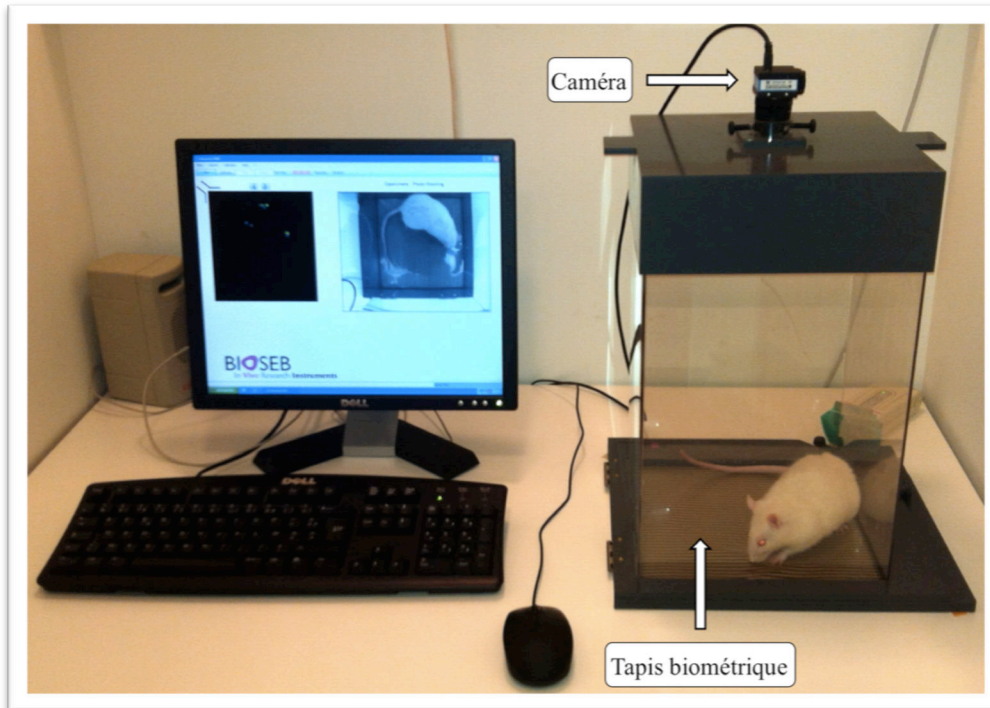
### *Test de la distribution pondérale : le « Dynamic Weight Bearing (DWB) »*

Le test de répartition pondérale mesure la pression exercée par chaque patte indépendamment les unes des autres lorsque l'animal est immobile (**Figure 1.19**). Il permet de quantifier et caractériser les altérations de la posture induite par une lésion. Le rat est placé dans une cage dont le sol est recouvert d'un tapis instrumenté de capteurs de pression. Le couvercle de l'appareil est également équipé d'une caméra vidéo (*Dynamic Weight Bearing, Bioseb® Development*, Vitrolles, France) facilitant l'identification des 4 pattes lors de

l'enregistrement. Ainsi les données récupérées *via* les capteurs sont synchronisées avec l'enregistrement vidéo des déplacements du rat sur le tapis. Deux essais de 5 minutes chacun sont réalisés. Deux paramètres sont analysés:

1) la pression exercée par la patte antérieure gauche est normalisée par rapport à celle de la patte antérieure droite (AG/AD). Il en est de même pour les pattes postérieures gauche et droite (PoG/PoD).

2) le temps que l'animal passe sur 3 et sur 4 pattes lors de l'enregistrement est mesuré. Si la patte affectée en position statique est moins utilisée, le temps passé sur 3 pattes devrait être plus long. Comme le temps passé en position statique peut varier considérablement d'un animal à un autre, le temps passé sous 3 ou sous 4 pattes est normalisé par rapport à la somme du temps passé sur 3 et 4 pattes (en position statique). Étant donné que le logiciel ne prend en compte que les moments où l'animal est en position statique lors des 5 minutes d'enregistrement, le temps passé sur 2 pattes, qui fait référence à la période d'exploration de la cage par l'animal, n'est pas pris en compte ici. Le temps passé sur 4 pattes est exprimé en % de la somme du temps passé sur 3 et 4 pattes.



**Figure 1.19 :** Dispositif spécifique au test de la distribution pondérale (DWB). La pression exercée par chaque patte est mesurée à l'aide d'un tapis biométrique composé de capteurs de pression.

### 5.2.5 Mesures électrophysiologiques

#### *Préparation de l'animal pour les enregistrements électrophysiologiques*

Les animaux sont anesthésiés avec de l'uréthane (100 mg/100 g) puis rasés au niveau de la patte antérieure gauche. Ils sont ensuite placés en décubitus dorsal tout au long de la procédure chirurgicale et de la phase d'enregistrement des paramètres électrophysiologiques. La température interne des animaux est maintenue à 37° C grâce à un tapis chauffant (*Harvard Homéothermique Blanket Control Unit*, K01345CE). La phase chirurgicale consiste à dégager le nerf musculospiral innervant le *triceps brachii* de la patte antérieure gauche. Les muscles *pectoralis major* et *minor* sont enlevés et le nerf musculospiral est alors mis en évidence. Tous les nerfs environnants sont sectionnés. La patte antérieure gauche est ensuite fixée durant toute l'expérimentation à un angle de 110°. Une jauge de contrainte est positionnée au niveau du poignet et s'oppose au mouvement induit par la stimulation électrique du nerf moteur.

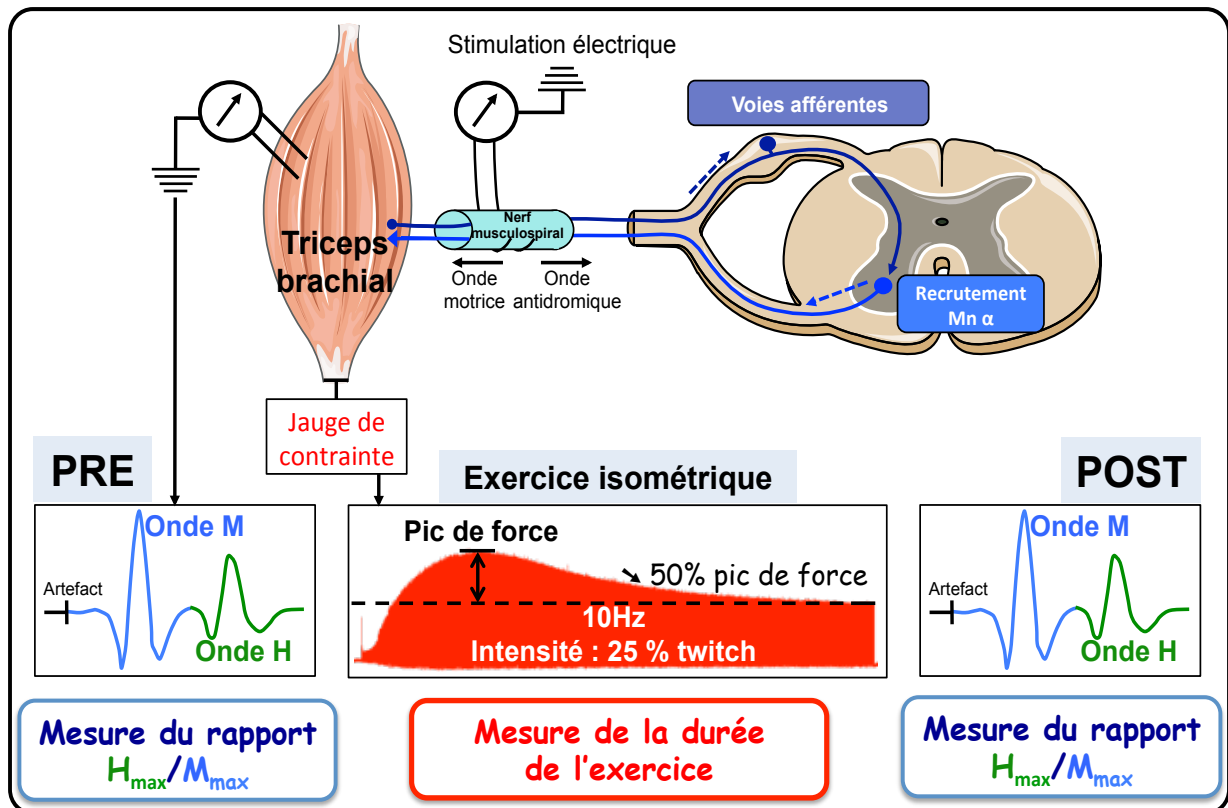
### *L'exercice isométrique évoqué électriquement*

L'exercice isométrique est évoqué par une série de contraction prolongée du muscle *triceps brachii* induite par une stimulation électrique de forme rectangulaire (fréquence de stimulation : 10 Hz, durée : 1 ms) au niveau du nerf musculospiral. La stimulation est délivrée par un neurostimulateur à courant constant (*Digitimer®*, *Constant Current Stimulator*, Model DS7A, Hertforshire, Royaume-Uni). La secousse musculaire élémentaire, appelée « *twitch* », est alors évoquée par une stimulation électrique unique du nerf moteur. Le *twitch* reflète les propriétés contractiles du muscle. L'amplitude maximale du *twitch* est alors enregistrée et va servir de référence pour déterminer l'intensité de l'exercice. Cette dernière est fixée à 25 % de l'amplitude du *twitch*. L'exercice est arrêté lorsque la baisse de la force devient < 50 % au pic de force obtenu pendant l'exercice (**Figure 1.20**). La durée de l'exercice est mesurée.

### *Obtention du réflexe-H avant et après l'exercice isométrique*

Le réflexe-H du *triceps brachii* est évoqué avant et après l'exercice isométrique. Pour obtenir les ondes M (voie motrice directe) et H (voie des réflexes somatiques), une stimulation électrique de forme rectangulaire (1 ms de durée), délivrée par le neurostimulateur à courant constant, est appliquée directement sur le nerf musculospiral (**Figure 1.20**). Une paire d'électrodes bipolaires d'enregistrement (*29-gauge*, *MLA 1204 Needle Electrodes*, 2 mm Pin, *AD instruments*, Oxford, Grand Bretagne) est insérée dans le *triceps brachii*. La position de ces électrodes d'enregistrement intramusculaires n'est pas modifiée au cours de l'expérimentation. Une électrode de référence est implantée dans des tissus environnants inertes. L'intensité de stimulation est augmentée progressivement jusqu'à atteindre l'amplitude maximale des ondes M et H ( $M_{\max}$  et  $H_{\max}$ ). Le signal est amplifié (2 kHz) et filtré (30 Hz à 10 kHz) avec un amplificateur différentiel (*P2MP SARL*, Marseille, France). Cinq ondes  $H_{\max}$  sont évoquées et moyennées avant et après la fatigue induite électriquement. Afin

de s'affranchir de la dépression post-activation durant l'enregistrement consécutif des ondes  $H_{\max}$ , la fréquence de stimulation est fixée à 0,1 Hz (Crone & Nielsen, 1989). L'onde  $H_{\max}$  est normalisée par l'onde  $M_{\max}$  (rapport  $H_{\max}/M_{\max}$ ) afin de s'affranchir des variations de l'excitabilité de la membrane musculaire ce qui a déjà été observée au cours d'un exercice isométrique (Zehr, 2002). En effet, toute modification de l'état de conduction des potentiels d'action au niveau de la membrane musculaire peut modifier considérablement la réponse du réflexe-H. De ce fait, toute mesure du réflexe-H doit limiter l'influence de l'excitabilité membranaire. Dans le cas contraire, l'amplitude de l'onde H ne reflèterait plus uniquement les mécanismes de modulation de l'activation motoneuronale au niveau spinal (recrutement et/ou fréquence de décharge) car ils seraient masqués par la modification de la conduction membranaire. Or, l'onde  $M_{\max}$  reflète l'état d'excitabilité membranaire (Zehr, 2002). Donc, pour tenir compte de ces variations, les auteurs ont coutume de calculer le rapport  $H_{\max}/M_{\max}$  afin de déterminer les modifications de l'onde H en fonction du niveau de l'excitabilité membranaire (Palmieri *et al.*, 2004).



**Figure 1.20 :** Dispositif expérimental pour les enregistrements électrophysiologiques de l'étude n°1. Les ondes M et H sont enregistrées avant et après l'exercice isométrique. L'intensité de l'exercice est basée sur 25 % du twitch. L'exercice est arrêté lorsque la baisse de force atteint 50 % par rapport au pic de force.

### 5.2.6 Analyse histologique : évaluation de la taille de la lésion cérébrale

#### *Perfusion intracardiaque et fixation des tissus nerveux*

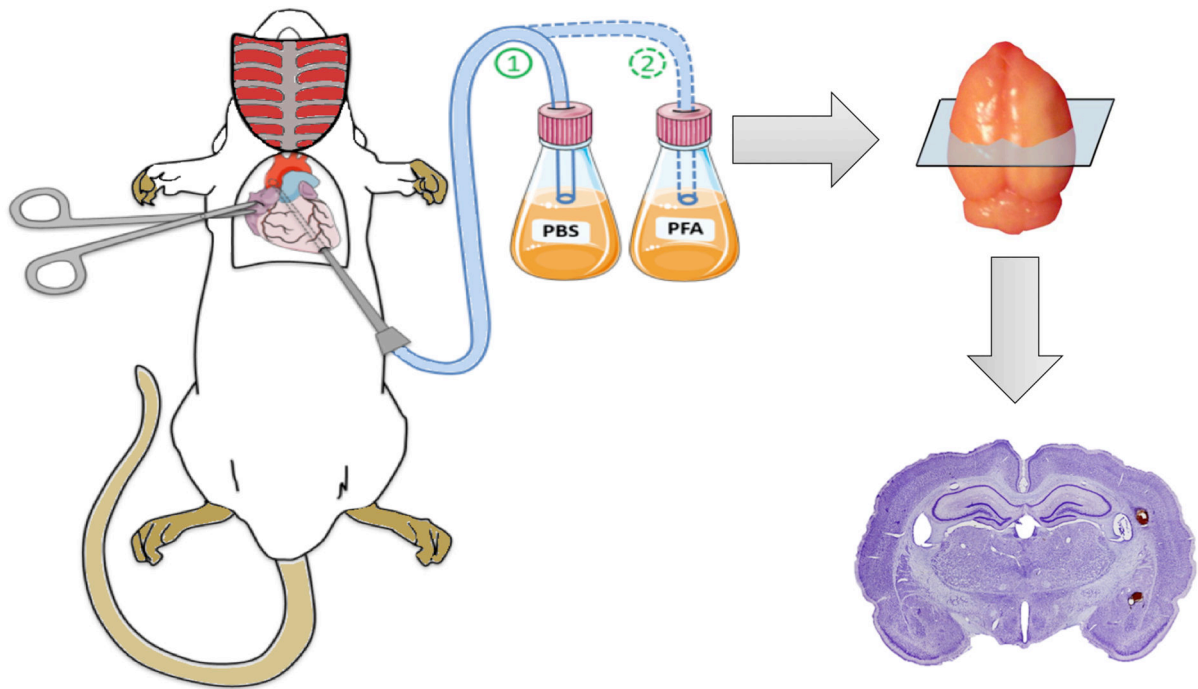
Une fois les mesures électrophysiologiques acquises, les animaux sont placés en décubitus dorsal. Après avoir dégagé le cœur des tissus environnants, le ventricule gauche est exposé et incisé. Une canule y est insérée jusque dans l'aorte permettant la perfusion intracardiaque. L'animal est perfusé à l'aide d'une pompe péristaltique (913 series Mytiflex® Variable Speed Peristaltic Pump, 25 ml/min, Bradenton, USA, États-Unis) à un débit de  $20 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  avec 250 ml de tampon phosphate salin (PBS-1X, concentration 0,1 M ; Sigma-Aldrich®) ( $7,2 < \text{pH} < 7,4$ ) permettant de le vider totalement de son sang. L'animal est ensuite perfusé avec 250 ml de paraformaldéhyde (PFA ; Sigma-Aldrich®) pour fixer les tissus nerveux avant qu'ils subissent des détériorations liées à l'hypoxie post-mortem (**Figure 1.21**).

L'encéphale est alors prélevé et conservé dans du PFA durant 24 h puis dans du sucrose à 30 % (jusqu'à ce qu'il coule au fond du récipient) afin de cryoprotéger les tissus avant qu'ils ne soient immergés dans de l'isopentane à -40 °C, pour être instantanément congelés, puis stockés à -80 °C. L'étape suivante consiste à réaliser des coupes coronales de cerveau d'une épaisseur de 30 µm à l'aide d'un cryostat. Ces dernières sont montées en série de 4 sur des lames en verre, de manière à ce que plusieurs lames présentent des niveaux de coupes identiques.

### *Coloration au crésyl violet*

Le crésyl violet met en évidence les corps de Nissl situés dans le corps cellulaire des neurones (Alvarez-Buylla *et al.*, 1990). Ainsi, la zone intacte ressort en bleue/violet tandis que la zone infarctée ressort plus claire. Les coupes sont immergées successivement dans des bains d'éthanol, de xylène, d'eau distillée, de crésyl violet, d'éthanol (75, 85, 95 et 100 %) et d'histolemon (**Figure 1.21**). Les lames sont finalement recouvertes par une lamelle avec du Permount<sup>®</sup> (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

L'acquisition des images est réalisée à l'aide d'un microscope Olympus BX50 équipé d'un appareil photo digital et d'une lentille X4. Pour chaque coupe, l'aire de la zone infarctée ainsi que l'aire totale de chaque hémisphère sont délimitées et calculées grâce au logiciel ImageJ (Türeyen *et al.*, 2004). La taille de la lésion est ensuite exprimée en pourcentage de l'hémisphère lésé et en pourcentage du cerveau total.



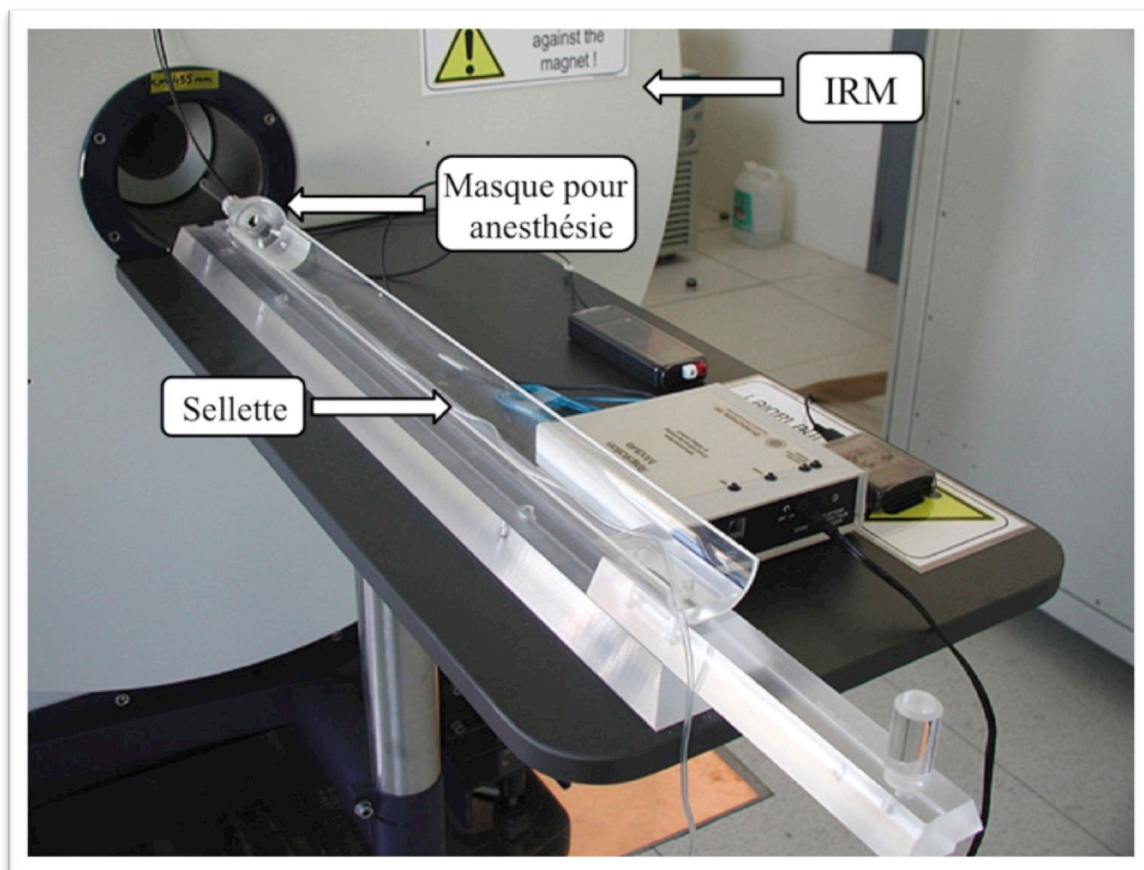
**Figure 1.21 :** *Dispositif expérimental pour la perfusion intracardiaque. Une canule est insérée dans le ventricule gauche puis remontée dans l'aorte. Du PBS et du PFA sont alors successivement injectés. Le cerveau est ensuite prélevé et tranché en plusieurs coupes de 30  $\mu$ m avant d'être coloré avec du crésyl violet.*

### 5.2.7 Imagerie par résonance magnétique (IRM) : évaluation de l'œdème cérébral

Les rats sont anesthésiés par voie gazeuse avec de l'isoflurane (phase d'induction à 4 % et phase de maintien entre 2 et 2,5 %). Les animaux sont d'abord placés dans la boîte à induction pendant  $\approx$  5 min avant que l'anesthésie ne soit prolongée au masque durant la phase de maintien. L'animal est introduit dans un système IRM horizontal (*Bruker Biospec Avance 4.7T/30, Bruker, Ettlingen, Allemagne*) en position ventrale sur une sellette en plastique dans laquelle de l'eau chaude circule afin de maintenir une température physiologique. Une sonde de pression est également disposée sous l'animal pour contrôler l'évolution de sa respiration. La tête de l'animal est fixée latéralement à l'aide de tiges en nylon placées au niveau des oreilles. Deux types d'acquisition sont effectués. Vingt coupes coronales de cerveau sont enregistrées à partir de la pondération T2 (coupes contiguës ; Temps d'Echo = 50 ms ; 1 mm d'épaisseur ; matrice = 256x256 pixels ; taille de l'image = 40x40 mm<sup>2</sup>) permettant de mettre



en surbrillance les zones œdémateuses (par analyse des protons de l'eau). À partir du logiciel ImageJ, le volume de l'œdème est déterminé par rapport 1) au volume de l'hémisphère droit et 2) au volume total de l'encéphale (**Figure 1.22**). Ensuite, 20 coupes coronales sont enregistrées en pondération T2\* (coupes contiguës ; TE = 15 ms ; idem pour les autres paramètres). Ce type de pondération est ici utilisée pour mettre en évidence les accumulations de sang (tâche noire sur les images IRM) afin de contrôler la présence ou non d'hémorragie intracérébrale (Kober *et al.*, 2008).



**Figure 1.22:** Dispositif IRM pour rongeur.

### 5.2.8 Analyses statistiques

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. L'analyse statistique est effectuée à partir du logiciel SigmaStat (*SigmaStat*<sup>®</sup> 2.03, *Statistical software*, San Jose, CA, États Unis). Les valeurs des tests comportementaux de J1 à J7 par rapport au PRE sont moyennées et comparées entre les groupes à partir d'une ANOVA à 2 facteurs (temps x groupes). Les résultats du réflexe-H sont moyennés et comparés entre les groupes à partir d'une ANOVA à mesures répétées et à 2 facteurs (PRE/POST exercice x groupes). Enfin, la durée de l'exercice est moyennée et comparée entre les groupes à partir d'une ANOVA à 1 facteur (comparaison entre les groupes uniquement). L'analyse post-hoc est réalisée à partir de la méthode *Student-Newman-Keuls* pour mettre en évidence les différences significatives. Un résultat est considéré significatif lorsque  $p < 0,05$ .

### **5.3 Résultats de l'étude n°1**

La masse des rats MCAo-J1 et J7 a diminué entre 11 et 19% au cours du protocole. Sur les 30 chirurgies MCAo-r réalisées dans le cadre de ce mémoire, 14 rats sont morts (taux de survie de 54,3%).

#### **5.3.1 Analyse comportementale : évaluation de la récupération fonctionnelle**

Pour l'ensemble des paramètres mesurés lors des tests de comportement, aucune différence significative n'est observée dans les groupes Témoins et SHAM-J7 au cours du protocole (de PRE à J7), excepté pour la mesure de la force de préhension (en g) dans le groupe SHAM-J7. De même, il n'y a pas de différence significative entre les groupes Témoins et SHAM-J7 pour l'ensemble des tests de comportement.

Les résultats des tests comportementaux obtenus pour le groupe MCAo-J1 sont similaires à ceux du groupe MCAo-J7 à J1 (cf. *Tableau 1.1* pour les résultats du groupe MCAo-J1, à l'exception de la répartition pondérale). Il n'y a pas non plus de différence significative entre les groupes Témoins et SHAM-J1 pour l'ensemble des tests.

	Témoins		SHAM-J1		MCAo-J1	
	PRE	J1	PRE	J1	PRE	J1
Suspension par la queue	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,52 ± 0,13	0,58 ± 0,13	0,5 ± 0,13	1 <sup>+</sup> *
Échelle	0,93 ± 0,05	0,96 ± 0,03	0,94 ± 0,05	0,91 ± 0,04	0,94 ± 0,02	0,43 ± 0,18 <sup>+</sup> *
Équilibre	120	120	120	120	120	0 <sup>+</sup> *
Force 2 pattes (g)	853 ± 87	930 ± 124	939 ± 85	967 ± 135	943 ± 105	883 ± 99
Force / poids	3,5 ± 0,2	3,6 ± 0,3	3,6 ± 0,3	3,7 ± 0,3	3,7 ± 0,4	4,0 ± 0,5 <sup>+</sup> *
Force G / D	0,92 ± 0,09	1 ± 0,14	0,96 ± 0,09	0,98 ± 0,12	1,09 ± 0,08	0,69 ± 0,07 <sup>+</sup> *
DWB Temps / 3 pattes	0,22 ± 0,13	0,21 ± 0,08	0,18 ± 0,08	0,27 ± 0,09	0,31 ± 0,12	0,37 ± 0,15 <sup>#</sup>
Temps / 4 pattes	0,35 ± 0,2	0,6 ± 0,17	0,54 ± 0,25	0,46 ± 0,28	0,55 ± 0,16	0,39 ± 0,24
Poids AG / AD	0,90 ± 0,24	1,27 ± 0,28	0,94 ± 0,52	1,38 ± 0,50	1,27 ± 0,85	0,79 ± 0,51
Poids PoG / PoD	1,01 ± 0,24	0,89 ± 0,14	1,04 ± 0,19	0,88 ± 0,25	1,18 ± 0,18	1,02 ± 0,64

**Tableau 1.1 : Résultats des tests comportementaux des groupes Témoins, SHAM-J1 et MCAo-J1.** Les valeurs PRE et J1 sont présentées. + indique les différences significatives entre les valeurs PRE et J1 ( $p < 0,001$ ). \* indique une différence significative entre le groupe MCAo-J1 et les 2 autres groupes ( $p < 0,001$ ). # indique une différence significative entre le groupe MCAo-J1 et le groupe Témoins ( $p < 0,05$ ).

**Score neurologique : vérification de la sévérité de la lésion**

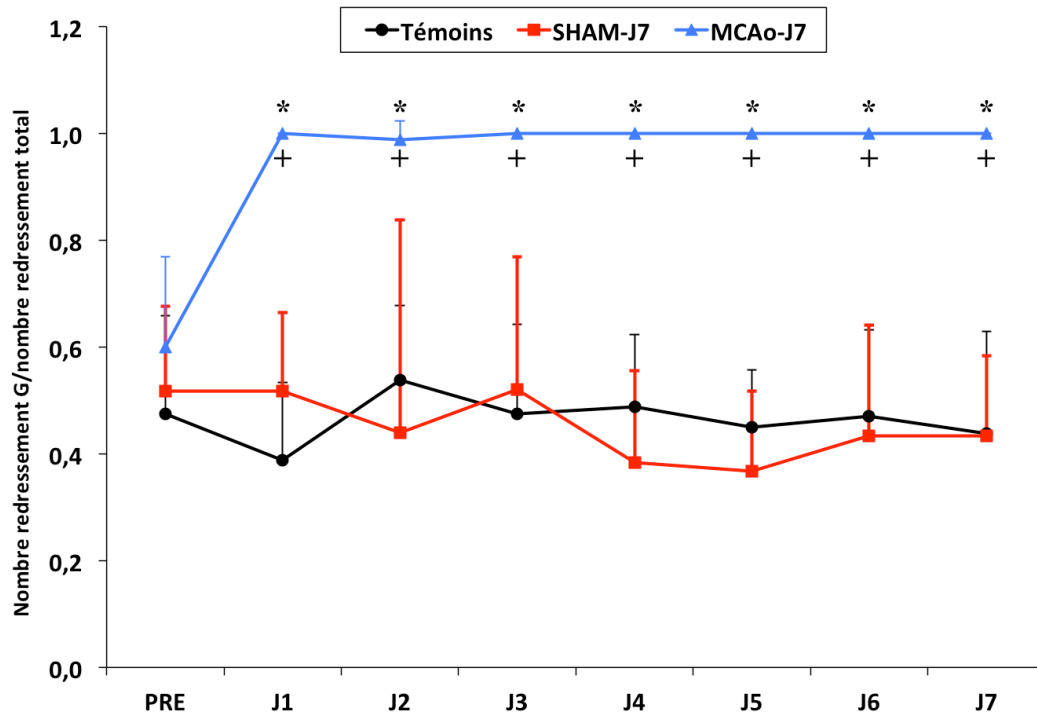
Le score neurologique du groupe MCAo-J7 est significativement plus élevé de J1 à J7 par rapport aux groupes Témoins et SHAM-J7 ( $p < 0,001$ ). Le score est de 4 à J1 et J2 et de 3 de J3 à J7 (**Tableau 1.2**).

	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
<b>Témoins</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>SHAM-J7</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>MCAo-J7</b>	4*	4*	3*	3*	3*	3*	3*

**Tableau 1.2 : Score neurologique des différents groupes d'animaux sur 1 semaine.** Ce score est compris entre 0 et 4 en fonction de la sévérité de la lésion. \* indique une différence significative entre le groupe MCAo-J7 et les 2 autres groupes ( $p < 0,001$ ).

**Test de suspension par la queue**

Le rapport entre le nombre redressement G/nombre redressement total augmente significativement de J1 à J7 par rapport à la valeur PRE dans le groupe MCAo-J7 (score PRE =  $0,6 \pm 0,17$  ; score de J1 à J7 = 1 ;  $p < 0,001$ ). En effet, les animaux du MCAo-J7 s'orientent exclusivement du côté gauche après la lésion cérébrale (**Figure 1.23**). Le nombre redressement G / nombre redressement total obtenu dans le groupe MCAo-J7 est significativement plus élevé par rapport aux groupes Témoins et SHAM-J7 de J1 à J7 ( $p < 0,001$  de J1 à J7).

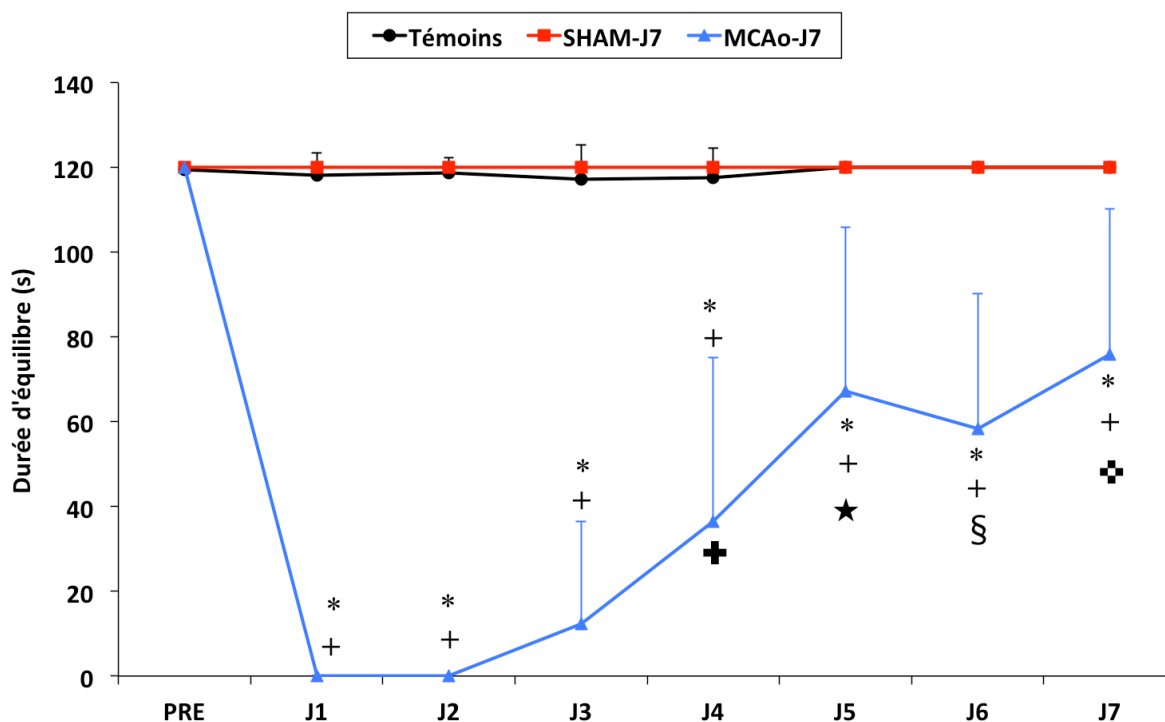


**Figure 1.23 : Test de suspension par la queue.** \* indique une augmentation significative du rapport nombre redressement G/nombre redressement total pour le groupe MCAo-J7 entre PRE et de J1 à J7 ( $p < 0,001$ ). + indique une augmentation du rapport nombre redressement G/nombre redressement total pour le groupe MCAo-J7 par rapport aux groupes Témoins et SHAM-J7 de J1 à J7 ( $p < 0,001$ ).

**Test de l'équilibre statique**

Le temps d'équilibre obtenu dans les groupes Témoins et SHAM-J7 est optimal au cours du protocole (120 s) (**Figure 1.24**). A l'inverse, le temps d'équilibre statique sur la poutre est fortement diminué dans le groupe MCAo-J7 de J1 à J7 par rapport aux valeurs PRE ( $p < 0,001$ ). Cependant, le temps d'équilibre augmente significativement à partir de J4 jusqu'à J7 (respectivement de J4 à J7 :  $36 \pm 39$  s ;  $67 \pm 39$  s ;  $58 \pm 32$  s ;  $76 \pm 34$  s) par rapport à J1, J2 et J3 ( $p < 0,001$ ).

Le temps d'équilibre est significativement plus court de J1 à J7 dans le groupe MCAo-J7 par rapport aux groupes Témoins et SHAM-J7 ( $p < 0,001$ ).

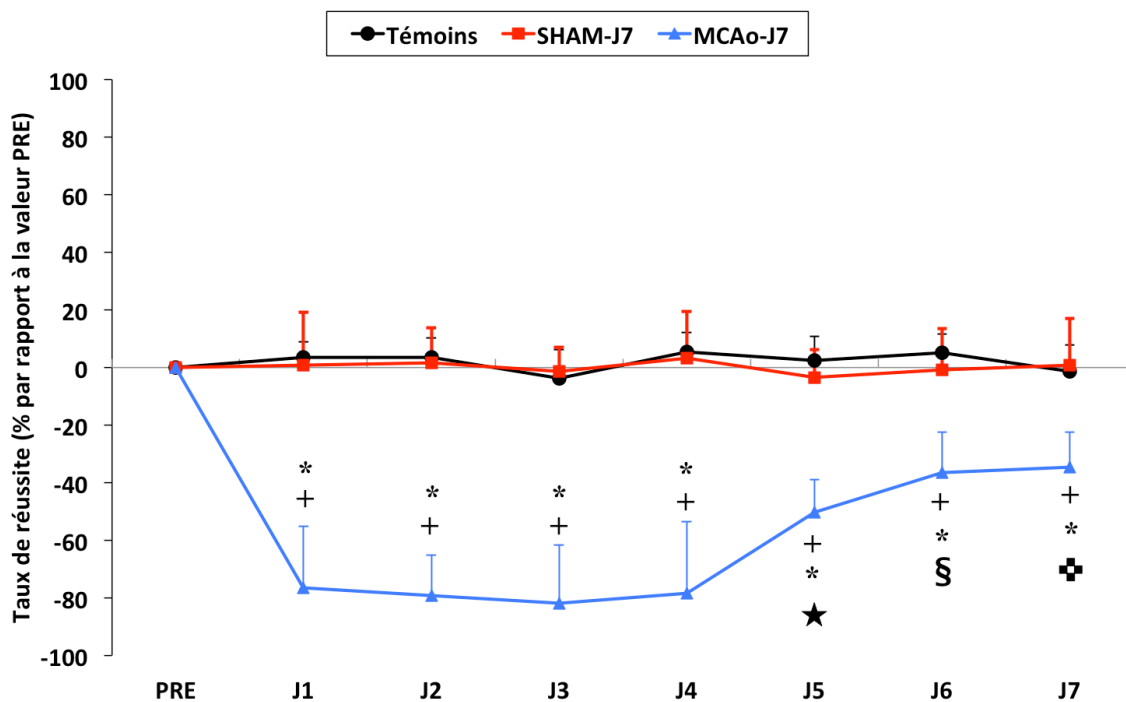


**Figure 1.24 : Test de l'équilibre statique.** \* indique une baisse significative du temps d'équilibre sur la poutre pour le groupe MCAo-J7 entre PRE et de J1 à J7 ( $p < 0,001$ ). + indique une baisse du temps d'équilibre pour le groupe MCAo-J7 par rapport aux groupes Témoins et SHAM-J7 de J1 à J7 ( $p < 0,001$ ). Pour le groupe MCAo-J7 : ✚ indique une différence significative entre J4 et J1 à J3 ; ★ indique une différence significative entre J5 et J1 à J4 ; § indique une différence entre J6 et J1 à J4 ( $p < 0,001$  pour tous) ; ✚ indique une différence entre J7 et J1 à J4 ( $p < 0,001$  pour tous).

**Test de l'échelle inclinée**

Le taux de réussite dans le groupe MCAo-J7 baisse significative de J1 à J7 par rapport aux valeurs PRE ( $p < 0,001$ ) (**Figure 1.25**). De plus, le taux de réussite augmente significativement à partir de J5 (respectivement de J5 à J7:  $0,44 \pm 0,09$  ;  $0,57 \pm 0,14$  ;  $0,59 \pm 0,12$ ) par rapport à J1-J4 (respectivement:  $0,21 \pm 0,20$  ;  $0,19 \pm 0,13$  ;  $0,16 \pm 0,18$  ,  $0,20 \pm 0,22$  ;  $p < 0,001$  pour toutes les valeurs).

Le taux de réussite est significativement plus faible chez les MCAo-J7 par rapport aux groupes Témoins et SHAM, et ce de J1 à J7 ( $p < 0,001$ ).



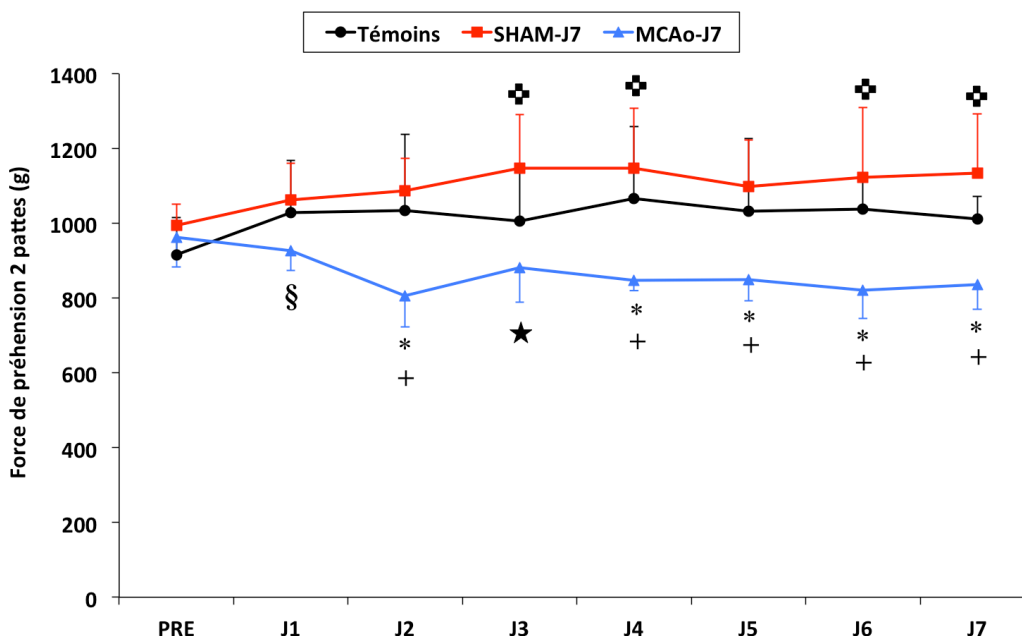
**Figure 1.25 : Test de l'échelle inclinée.** \* indique une baisse du taux de réussite pour le groupe MCAo-J7 entre PRE et de J1 à J7 ( $p < 0,001$ ). Le taux de réussite est exprimé en % dans le graphique. + indique une baisse du taux de réussite pour le groupe MCAo-J7 par rapport aux groupes Témoins et SHAM-J7 de J1 à J7 ( $p < 0,001$ ). Pour le groupe MCAo-J7 : ✚ différence significative entre J7 et J1 à J5 ; § différence significative entre J6 et J1 à J5 ; ★ différence significative entre J5 et J1 à J4 ( $p < 0,001$ ).



*Test de force de préhension des pattes antérieures*

**Force produite avec les 2 pattes antérieures.** La force diminue significativement pour le groupe MCAo-J7 à J2, J4, J5, J6 et J7 (respectivement 806±83 g ; 847±27 g ; 849±57 g ; 821±75 g ; 837±67 g,  $p < 0,05$ ) par rapport aux valeurs PRE (963±80 g) alors qu'aucune différence significative n'est observée à J1 et à J3 (respectivement : 927±53 g ; 881±92 g,  $p = 0,07$ ) (**Figure 1.26**). Ajoutons à cela que la force produite à J1, toujours dans le groupe MCAo-J7, est significativement plus élevée par rapport à celle observée à J2 ( $p < 0,05$ ). Par ailleurs, la force augmente significativement pour le groupe SHAM-J7 à J3, J4, J6 et J7 (respectivement 1148±143 g ; 1148±160 g ; 1123±186 g ; 1135±158 g,  $p < 0,05$ ) par rapport aux valeurs PRE (994±58 g).

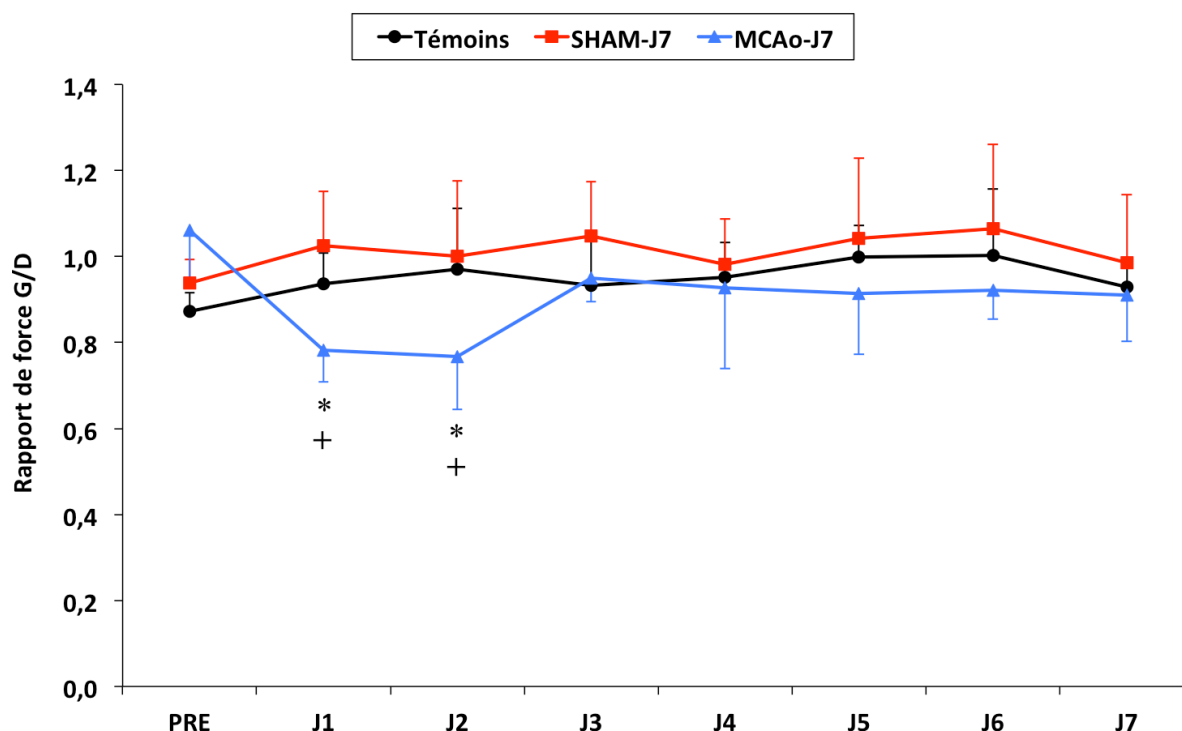
La force mesurée pour le groupe MCAo-J7 est significativement inférieure de J2 à J7 par rapport aux groupes Témoins ( $p < 0,01$ ) et SHAM-J7 ( $p < 0,001$ ), excepté à J3 où la force produite dans le groupe MCAo-J7 est significativement plus faible par rapport au groupe SHAM-J7 ( $p < 0,001$ ).



**Figure 1.26 :** Force de préhension exprimée en grammes (g) produite avec les 2 pattes simultanément. \* indique une diminution de la force pour le groupe MCAo-J7 entre PRE et J2, J4, J5, J6 et J7. § indique une diminution de la force entre J1 et J2 pour le groupe MCAo-J7. + indique une différence significative entre les groupes MCAo-J7 et Témoins et SHAM-J7 ( $p < 0,01$ ). ★ indique une différence significative entre les groupes MCAo-J7 et SHAM-J7 uniquement. ✚ indique une augmentation de la force pour le groupe SHAM-J7 à J3, J4, J6 et J7.

**Rapport de force entre patte gauche/patte droite.** Le rapport G/D diminue significativement entre PRE et J1 ainsi qu'entre PRE et J2 (PRE =  $1,1 \pm 0,1$  ; J1 et J2 =  $0,8 \pm 0,1$  ;  $p < 0,001$  pour les 2) (**Figure 1.27**).

Le rapport G/D est inférieur dans le groupe MCAo-J7 par rapport aux groupes Témoins (PRE =  $0,9 \pm 0,04$  ; J1 =  $0,9 \pm 0,1$  ; J2 =  $1,0 \pm 0,1$  ;  $p < 0,01$  pour les 2) et SHAM-J7 (PRE =  $0,9 \pm 0,1$  ; J1 =  $1,0 \pm 0,1$  ; J2 =  $1,0 \pm 0,2$  ;  $p < 0,001$  pour les 2), exclusivement à J1 et J2



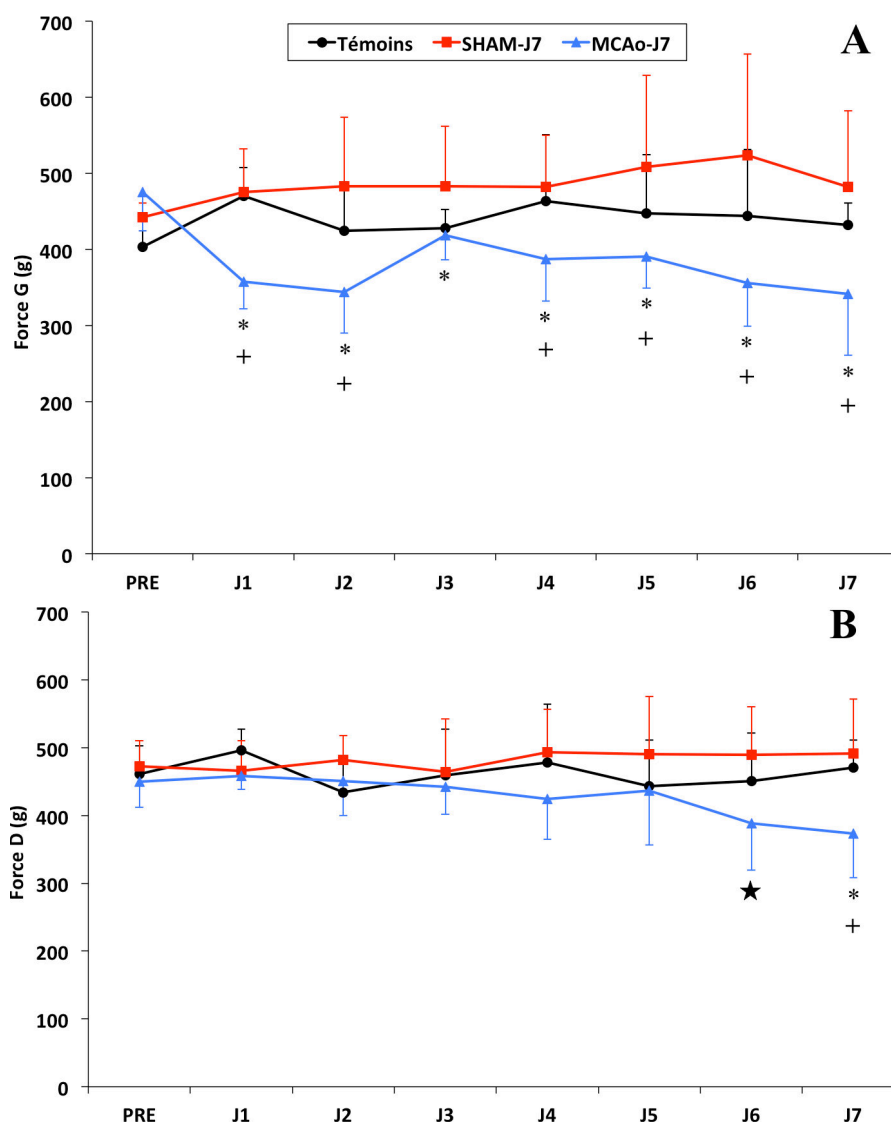
**Figure 1.27 :** Rapport de force patte gauche sur patte droite. \* indique une diminution du rapport pour le groupe MCAo-J7 entre PRE et J1-J2. + indique une différence significative entre le groupe MCAo-J7 et les groupes Témoins et SHAM-J7 ( $p < 0,01$ ).

**Force produite avec la patte antérieure gauche.** Dans le groupe MCAo-J7, la force diminue significativement par rapport au PRE ( $475 \pm 51$  g) de J1 à J7 (respectivement  $358 \pm 36$  g ;  $344 \pm 54$  g ;  $356 \pm 57$  g ;  $342 \pm 81$  g pour J1, J2, J6 et J7 ;  $p < 0,001$  ; respectivement  $419 \pm 32$  g ;  $387 \pm 55$  g ;  $390 \pm 41$  g pour J3, J4 et J5 ;  $p < 0,05$ ) (**Figure 1.28.A**).

La force (g) est significativement inférieure dans le groupe MCAo-J7 par rapport aux Témoins et aux SHAM-J7 de J1 à J7 ( $p < 0,05$ ) excepté pour J3.

**Force produite avec la patte antérieure droite.** Dans le groupe MCAo-J7, aucune différence significative n'est observée de J1 à J6 par rapport au PRE (450±38 g), contrairement à J7 (373±65 g) où nous avons observé une diminution de la force par rapport aux valeurs PRE ( $p<0,05$ ), J1 (458±20 g ;  $p<0,01$ ), J2 (451±51 g ;  $p<0,05$ ), J3 (442±40 g ;  $p<0,05$ ) et J5 (436±80g ;  $p<0,05$ ) (**Figure 1.28.B**).

La force est significativement inférieure dans le groupe MCAo-J7 par rapport au groupe Témoins à J7 ( $p<0,01$ ) et au groupe SHAM-J7 à J6 et J7 ( $p<0,01$ ).

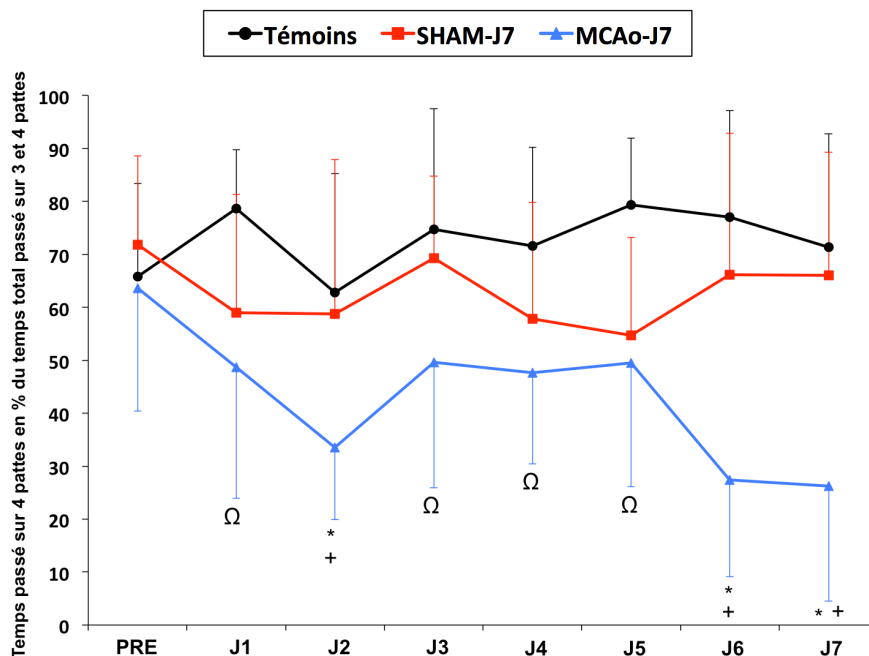


**Figure 1.28 :** Force de préhension produite par A) la patte gauche et B) la patte droite. Elle est exprimée en grammes (g). \* indique une baisse de la force G à J1, J2, J6 et J7 ( $p<0,001$ ) et à J3, J4, J5 ( $p<0,05$ ) par rapport à PRE dans le groupe MCAo-J7 ainsi qu'une baisse de la force D à J7 ( $p<0,05$ ) par rapport à PRE et à J1-J5. + indique une force G inférieure pour le groupe MCAo-J7 de J1 à J7 ( $p<0,005$ ), excepté à J3, par rapport aux groupes Témoins et SHAM-J7 ainsi qu'une force D inférieure à J7 par rapport aux groupes Témoins et SHAM-J7 ( $p<0,01$ ). ★ indique une force D inférieure à J6 pour le groupe MCAo-J7 par rapport au groupes SHAM-J7 uniquement ( $p<0,001$ ).

**Test de la distribution pondérale: le DWB**

**Répartition de la pression exercée sous chaque patte.** Le rapport pondéral entre les pattes antérieures gauche/droite (AG/AD) et celui entre les pattes postérieures gauche/droite (PoG/PoD) ne changent pas significativement durant tout le protocole par rapport aux valeurs PRE pour le groupe MCAo-J7 comme pour les 2 autres groupes (Témoins, SHAM-J7). De plus, aucune différence n'est observée entre les groupes (*données non présentées*).

**Répartition du temps passé sur 4 pattes.** Le temps passé sur 4 pattes dans le groupe MCAo-J7 à J2 ( $p < 0,05$ ), J6 et J7 ( $p < 0,001$ ) est plus court par rapport aux valeurs PRE (**Figure 1.29**). Le temps passé sur les 4 pattes de J1 à J7 dans le groupe MCAo-J7 est significativement plus court que celui du groupe Témoins ( $p < 0,01$  ;  $p < 0,01$  ;  $p < 0,05$  ;  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  ;  $p < 0,001$  et  $p < 0,001$  respectivement). Le temps passé sur 4 pattes à J2, J6 et J7 est significativement plus court que celui du groupe SHAM-J7 ( $p < 0,05$  ;  $p < 0,001$  et  $p < 0,001$  respectivement).

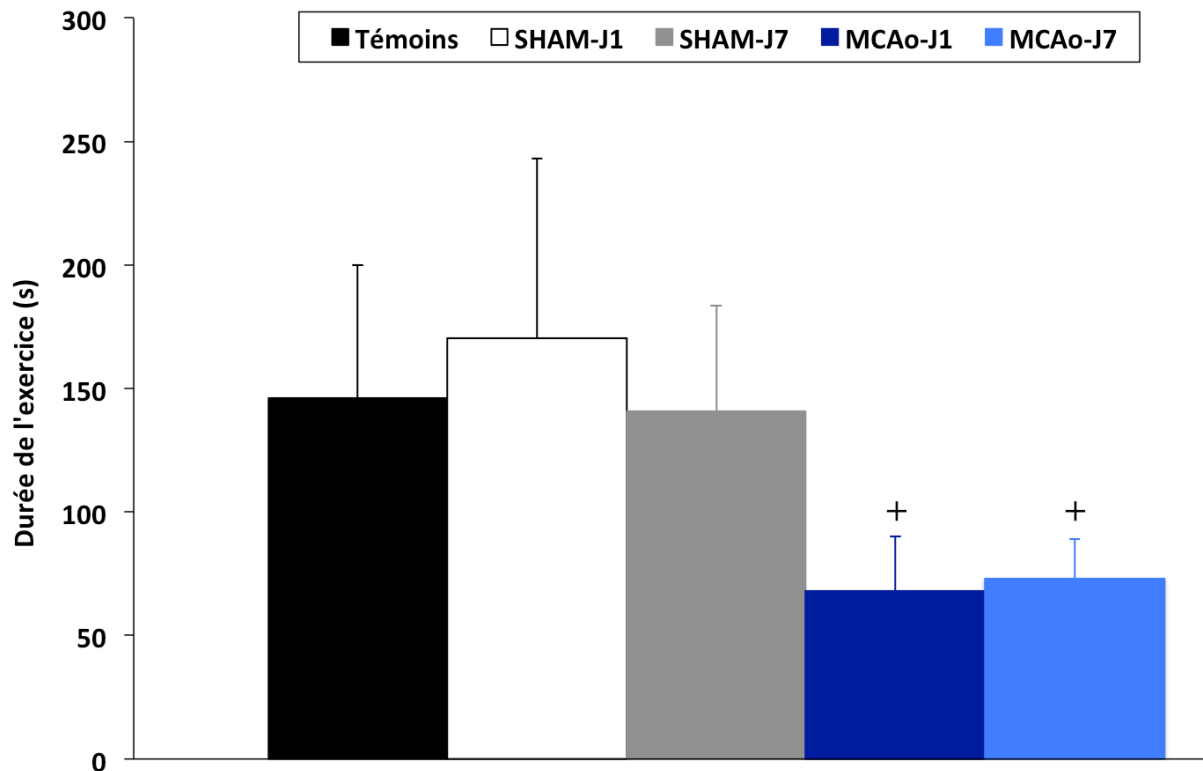


**Figure 1.29 :** Test de distribution pondérale - répartition des appuis en fonction du temps passé sur 4 pattes. Temps passé sur 4 pattes est exprimé en % du temps statique total (somme des temps passés sur 3 et 4 pattes). \* indique une diminution significative pour le groupe MCAo-J7 entre PRE et J2, J6 et J7 ; + indique une baisse supérieure pour le groupe MCAo-J7 par rapport aux groupes Témoins et SHAM-J7 ; Ω indique une baisse supérieure pour le groupe MCAo-J7 par rapport au groupe Témoins.

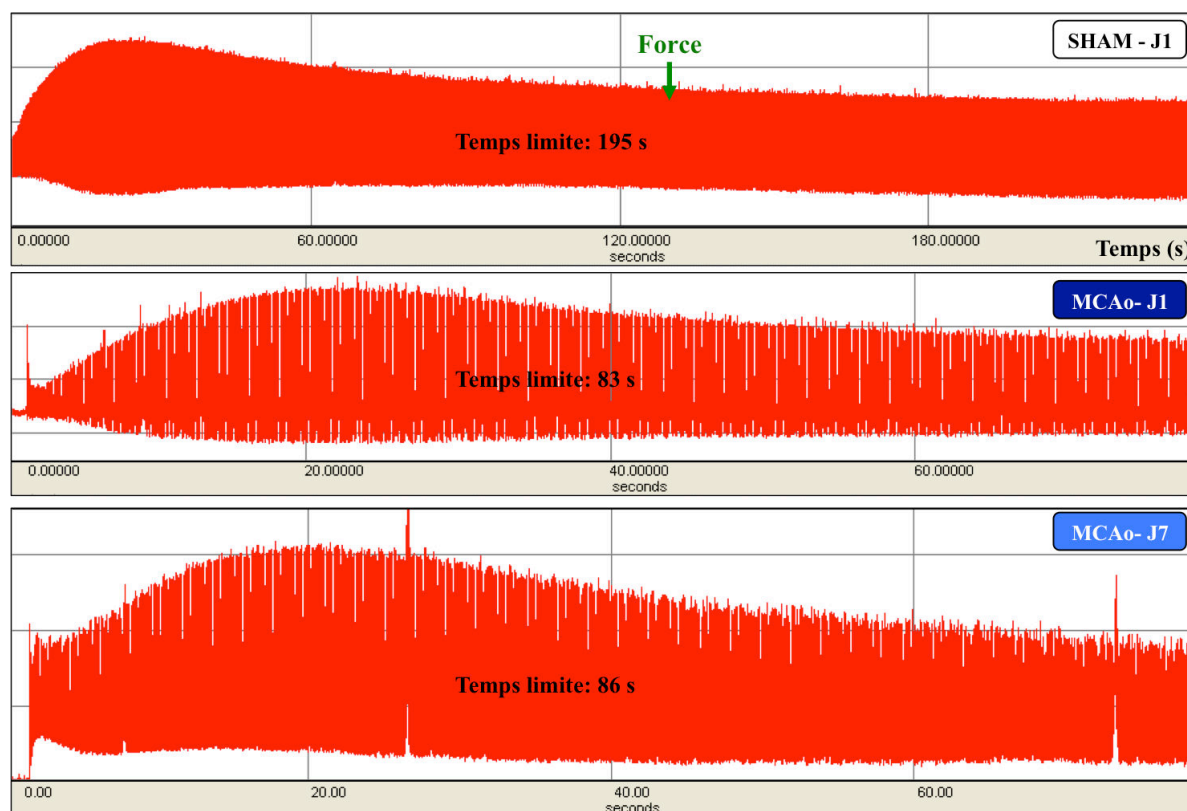
### 5.3.2 Mesures électrophysiologiques

#### *Exercice isométrique*

Au cours de l'exercice isométrique, le temps nécessaire pour atteindre une force égale à 50% de la force maximale obtenue au cours de l'exercice est significativement plus court pour les groupes MCAo-J1 et MCAo-J7 par rapport aux groupes SHAM-J1, SHAM-J7 et Témoins (respectivement pour MCAo-J1 et MCAo-J7 :  $68 \pm 22$  s ;  $73 \pm 16$  s et  $171 \pm 73$  s ;  $141 \pm 43$  s ;  $146 \pm 54$  s pour SHAM-J1, SHAM-J7 et Témoins ;  $p < 0,01$ ) (**Figure 1.30 et 1.31**). Aucune différence n'a été trouvée entre les groupes SHAM-J1, SHAM-J7 et Témoins.



**Figure 1.30:** *Durée de l'exercice isométrique induit par une stimulation électrique au niveau du nerf musculospiral.* + indique une différence significative entre les groupes MCAo-J1 et MCAo-J7 en comparaison avec les groupes Témoins, SHAM-J1 et SHAM-J7 ( $p < 0,01$ ).

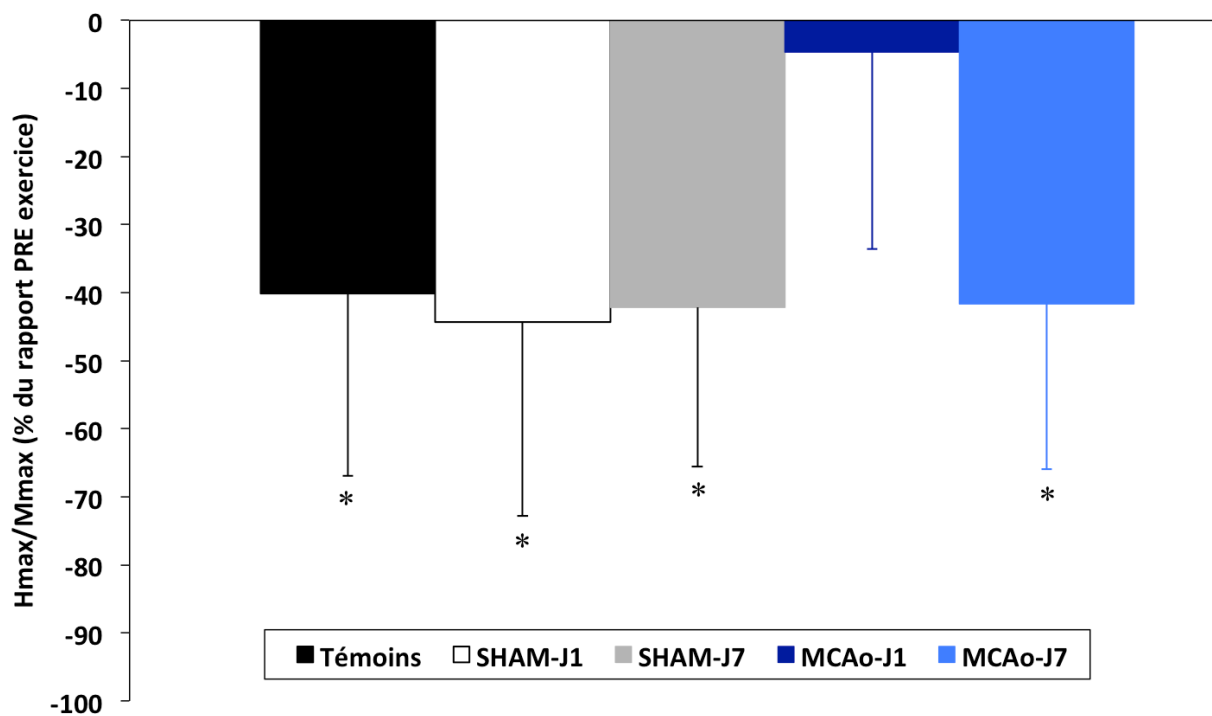


**Figure 1.31 :** Exemple de l'évolution d'une force au cours d'un exercice isométrique induit électriquement chez un rat SHAM, MCAo-J1 et MCAo-J7. Le temps pour atteindre une force égale à 50 % de la force maximale durant l'exercice est beaucoup plus court chez les animaux des groupes lésés que chez le rat SHAM.

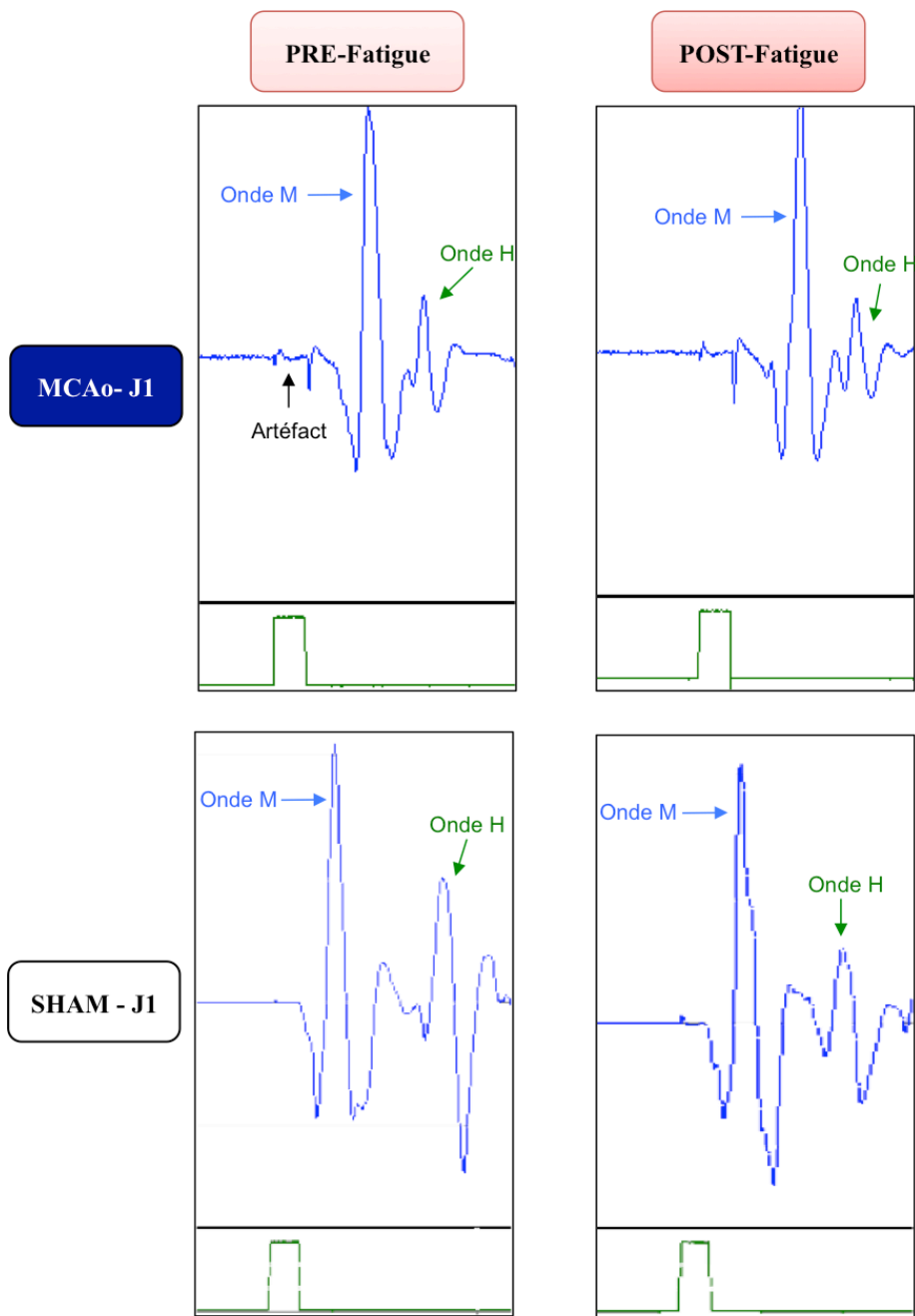
*Réflexe-H avant et après exercice isométrique*

Le rapport  $H_{max}/M_{max}$  obtenu avant l'exercice isométrique (donc dans les conditions de repos) n'est pas significativement différent après l'ischémie par rapport à celui des animaux des groupes Témoin et SHAM (**Figure 1.32**).

Le rapport  $H_{max}/M_{max}$  obtenu après l'exercice isométrique diminue significativement dans les groupes Témoins (-40±27%), SHAM-J1 (-44±28%), SHAM-J7 (-42±23%) et MCAo-J7 (-42±24%) par rapport au  $H_{max}/M_{max}$  mesuré avant l'exercice ( $p<0,01$  pour tous ces groupes). Cependant, le rapport  $H_{max}/M_{max}$  ne diminue pas significativement pour le groupe MCAo-J1 après l'exercice isométrique (-5±29%) (**Figure 1.32 et 1.33**).



**Figure 1.32 : Modification du rapport  $H_{max}/M_{max}$  après l'exercice isométrique.** \* indique une diminution significative de  $H_{max}/M_{max}$  obtenu après l'exercice par rapport à  $H_{max}/M_{max}$  obtenu avant l'exercice pour les groupes Témoins, SHAM-J1, SHAM-J7 et MCAo-J7 ( $p<0,01$ ). Il n'y a pas de différence significative pour le groupe MCAo-J1.



**Figure 1.33 :** Exemple de réflexe-H observés avant et après la fatigue induite électriquement chez un rat SHAM et un rat MCAo-J1. Nous pouvons constater que l'amplitude de l'onde H a fortement diminué après la fatigue chez le rat SHAM par rapport à l'onde H PRE-fatigue alors que chez le rat MCAo-J1, l'onde H reste inchangée.

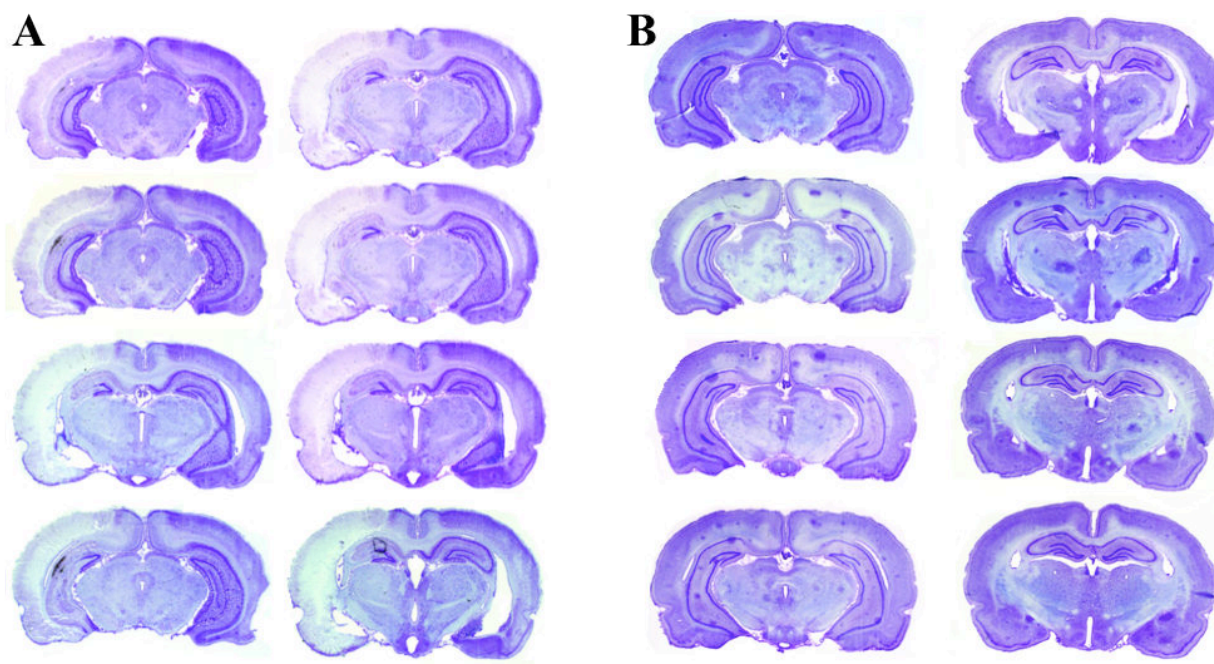


### 5.3.3 Analyse histologique : taille de la lésion cérébrale

Les animaux lésés du groupe MCAo-J1 présentent une lésion qui s'étend sur la moitié de l'hémisphère droit (**Figure 1.34.A**). Cette surface de lésion est diminuée chez les animaux lésés du groupe MCAo-J7 (**Tableau 1.3**). En revanche, aucune trace de lésion n'est observée chez les animaux SHAM (**Figure 1.34.B**) et Témoins lors de l'analyse histologique.

	MCAo-J1	MCAo-J7
Surface lésion/Surface HD (%)	50 ± 6	41 ± 6
Surface lésion/Surface encéphale (%)	25 ± 4	21 ± 2

**Tableau 1.3 :** Quantification de la zone infarctée au Crésyl violet. L'étendue de la lésion cérébrale au niveau de l'hémisphère droit (HD) après induction d'une ischémie cérébrale par MCAo-r est mesurée à J1 et J7. Les valeurs sont moyennées et sont exprimées en % soit de l'HD soit de l'aire totale de la coupe.



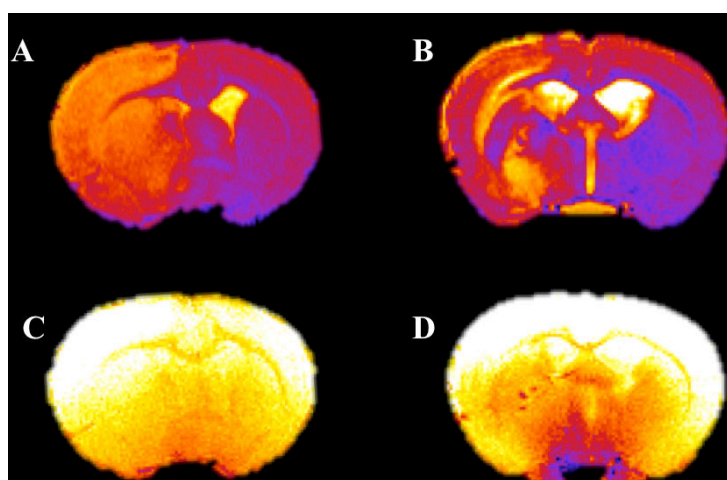
**Figure 1.34:** Coupes marquées au Crésyl Violet suite à l'ischémie induite par la MCAo-r. A) Coupes d'encéphale de rat MCAO-J1 ; B) Coupes d'encéphale de rat SHAM-J1.

### 5.3.4 IRM : étendu de l'œdème cérébral

L'analyse IRM des animaux Témoins et SHAM ne révèle ni œdème, ni hémorragie cérébrale. En ce qui concerne les deux animaux MCAo, l'œdème cérébral n'est observé qu'au niveau de l'hémisphère droit, à partir de l'analyse  $T_2$  (Figure 1.35.A et B). Pour le rat 1, l'œdème couvre 51 % de l'hémisphère droit et 27 % de l'encéphale total à J1. Le volume de l'œdème à J7 diminue de 29 % par rapport au volume de l'hémisphère droit et de 30 % lorsque l'on se réfère au volume total de l'encéphale. Le volume de l'œdème pour le rat 8 évolue d'une manière très similaire au rat 1 à J1 comme à J7 (Tableau 1.4). Par ailleurs, aucune hémorragie cérébrale n'a été observée pour ces deux animaux lésés d'après les coupes  $T_2^*$  (Figure 1.35.C et D).

	Rat 1		Rat 8	
	J1	J7	J1	J7
Volume de l'œdème (mm <sup>3</sup> )	447	284	450	302
Volume de l'hémisphère droit (mm <sup>3</sup> )	868	789	871	792
Volume de l'encéphale (mm <sup>3</sup> )	1689	1565	1656	1554

**Tableau 1.4 : Analyse IRM ( $T_2$ ).** Étendue de l'œdème cérébral au niveau de l'hémisphère droit après induction d'une ischémie cérébrale par la méthode MCAo-r sur 2 rats. Ces mesures ont été réalisées à J1 et J7.



**Figure 1.35 : Imagerie par résonance magnétique suite à une ischémie cérébrale par la méthode MCAo-r.** (A) Représentation de coupes coronaires obtenues par IRM en pondération  $T_2$  à J1 et (B) J7 post-ischémique et en pondération  $T_2^*$  (C) à J1 et (D) à J7 post-ischémique.

### *5.4 Discussion de l'étude n°1*

Les résultats principaux de l'étude n°1 montre que l'ischémie cérébrale induit une fatigue musculaire précoce ainsi qu'une modification de la régulation des réflexes moteurs du *triceps brachii* post-exercice. Ces résultats semblent révéler une adaptation de la boucle sensorimotrice suite à une MCAo-r. Cependant, la régulation du réflexe-H post-exercice semble rétablie 7 jours après la lésion cérébrale bien qu'une fatigue neuromusculaire précoce soit toujours présente. Par ailleurs, nous avons approfondi la nature des déficits sensorimoteurs au niveau de la patte antérieure gauche à travers la mesure de la force de préhension de chaque patte, des adaptations posturales impliquant le support de poids et l'équilibre statique. Nous avons montré que ces déficits peuvent persister pendant les 7 premiers jours post MCAo-r.

### *Considérations méthodologiques*

La similarité des résultats obtenus pour les groupes Témoins et SHAM semble confirmer que les tests comportementaux sont fiables sur une évaluation d'une semaine. De plus, les résultats des animaux SHAM assurent que les premières étapes de la chirurgie MCAo-r n'influencent pas les paramètres neuromusculaires enregistrés. Seule la force de préhension obtenue avec les 2 pattes antérieures dans le groupe SHAM augmente au cours de la semaine post-chirurgie ce qui pourrait être associé à une élévation du stress souvent observée après un acte chirurgical (Desborough, 2000). Les animaux ont en effet tendance à agripper plus fermement la barre de force dans ces conditions (comme ceci est le cas dans la phase de familiarisation). Néanmoins, ce résultat ne ressemble pas à celui des animaux lésés car il est opposé. Les perturbations observées sur les différents tests de comportement peuvent donc être considérées comme directement liées à l'occlusion cérébrale induite par chirurgie.

Au vu de l'étendue de l'œdème cérébral évaluée par IRM et de la zone infarctée déterminée par la coloration au crésyl violet en histologie, la chirurgie MCAo-r n'affecte directement que l'hémisphère droit, et ce, de manière reproductible. Ces deux mesures nous assurent que nos animaux présentent une lésion cérébrale similaire lors de l'évaluation des modifications neuromusculaires au niveau de la boucle sensorimotrice.

Plusieurs preuves indiquent clairement que les conditions d'enregistrement du réflexe-H sont similaires pour chaque animal : 1) l'onde H augmente progressivement avec l'intensité de stimulation à partir de son apparition jusqu'à son amplitude maximale ce qui est en accord avec une étude précédente (Cliffer *et al.*, 1998), 2) le réflexe-H n'est pas aboli lorsque la stimulation est appliquée à l'intensité correspondante à l'onde  $M_{max}$ , 3) l'intensité de stimulation requise pour obtenir  $H_{max}$  est supérieure ou égale à celle requise pour obtenir  $M_{max}$  comme cela a déjà été décrit (Gozariu *et al.*, 1998), 4) l'amplitude de l'onde M est toujours plus élevée que celle de l'onde H quelque soit l'intensité de stimulation et 5) le temps de latence est similaire entre l'onde H et l'onde M au cours des différentes mesures réalisées (l'onde H apparaît toujours après l'onde M). Il est important de rajouter que la position des électrodes d'enregistrement n'est pas modifiée au cours du protocole entre les mesures PRE et POST-exercice afin d'assurer une comparaison fiable entre ces 2 mesures. De plus, le rapport  $H_{max}/M_{max}$  permet de s'affranchir de l'état de propagation des potentiels d'action le long de la membrane musculaire. Ainsi, l'amplitude de l'onde H ne reflèterait que les mécanismes de modulation de l'activation motoneuronale au niveau spinal (Palmieri *et al.*, 2004).

La contraction isométrique sous-maximale réalisée jusqu'à épuisement constitue un modèle d'étude approprié pour 1) mesurer le niveau de fatigue (en se basant sur le temps limite) et 2) évaluer la régulation des mécanismes spinaux après un AVC. D'une part, il permet de stimuler rapidement la production de métabolites en se ciblant sur un seul muscle d'intérêt (ici le triceps brachii). D'autre part, il permet de détecter facilement

l'apparition de la fatigue en se basant sur la diminution de la force musculaire. Enfin, il permet de conserver la position des électrodes avant et après contraction pour l'enregistrement du réflexe-H, laissant ainsi la possibilité de pouvoir faire la comparaison PRE et POST exercice.

### *Le réflexe-H n'est pas modifié au repos suite à une ischémie cérébrale.*

Le réflexe-H obtenu au repos (avant l'exercice isométrique) des animaux lésés est similaire à celui des animaux Témoin et SHAM. Notre étude montre donc que l'efficacité de la transmission synaptique entre les afférences de gros diamètre (groupes I et II) et les motoneurones- $\alpha$  ne semble pas être perturbée dans les conditions de repos. Ceci est en contradiction avec des résultats précédents obtenus chez des patients AVC qui montrent une augmentation significative du réflexe-H de repos (Hwang *et al.*, 2004; Phadke *et al.*, 2012).

### *L'exercice isométrique met en évidence une fatigue précoce et une perturbation des réflexes somatiques suite à l'ischémie cérébrale.*

La fatigue apparaît de manière précoce chez les animaux lésés au cours de l'exercice isométrique ce qui n'avait jamais été mis en évidence auparavant. De plus, la réponse du réflexe-H est fortement perturbée après un exercice isométrique un jour après la lésion puisqu'il ne varie pas, contrairement aux groupes de référence où ce réflexe est fortement diminué.

Notre étude ne nous permet pas de déterminer les mécanismes sous-jacents à la régulation des réflexes somatiques et de la fatigue musculaire mais nous pouvons suggérer que ces 2 résultats peuvent être partiellement expliqués par une perturbation de l'activité des afférences métabosensibles (groupes III et IV) qui sont bien connues pour être activées par les métabolites accumulés dans le muscle (Rotto & Kaufman, 1988; Adreani *et al.*, 1997;

Gandevia, 2001). Plusieurs études révèlent que ces afférences jouent un rôle important dans la régulation de l'activité motrice pendant et après un effort fatigant (Pettorossi *et al.*, 1999; Laurin *et al.*, 2015). De nombreux auteurs suggèrent que l'action de ces afférences permettrait de limiter une fatigue prématurée en informant le SNC des modifications métaboliques dans le but d'optimiser la performance musculaire. Elles permettraient également d'éviter une altération excessive de la structure musculaire selon la théorie du « *muscle wisdom* » (Bigland-Ritchie & Woods, 1984; Bigland-Ritchie *et al.*, 1986; Amann *et al.*, 2011). Par exemple, il a été observé une baisse supérieure de la production de force après 3 min de stimulation électrique musculaire chez les rats dont les afférences métabosensibles ont été détruites *via* l'injection de capsaïcine par rapport aux animaux contrôles (Dousset *et al.*, 2004). La contribution de ces afférences à la performance physique est confirmée par une étude menée chez l'Homme où lorsque les récepteurs des afférences métabosensibles sont bloqués par l'injection d'un antagoniste (le fentanyl), la performance sur un temps limite (80 % de la puissance maximale) est diminuée de 21 % et semble associée à une fatigue périphérique importante (Amann *et al.*, 2011).

Il paraît important de souligner que ceux ne sont pas les seuls groupes d'afférences musculaire à être stimulées pendant un exercice isométrique. En effet, les modifications mécaniques provoquées par la contraction musculaire stimulent également les afférences des groupes I et II mais aussi les afférences mécanosensibles de petit diamètre (essentiellement les afférences des groupes III). Cependant, les études précédentes montrent une modification de la performance sans modification de l'action des afférences musculaires mécanosensibles.

Par ailleurs, l'absence de modification de réflexe-H post-exercice observée à J1 pourrait être aussi associée à une perturbation de l'activité des afférences musculaires métabosensibles. En effet, les afférences des groupes III et IV restent activées après un

exercice fatigant car les produits métaboliques du muscle ne sont pas éliminés immédiatement (Haouzi *et al.*, 1999). De plus, ces afférences peuvent inhiber le réflexe-H en agissant au niveau pré-synaptique des afférences du groupe Ia (et réflexe monosynaptique) ou diminuer l'excitabilité motoneuronale sur des animaux sains (Kniffki *et al.*, 1981; Schomburg *et al.*, 1999; Laurin *et al.*, 2010). Ainsi, nous postulons que ceux sont les seuls types d'afférences pouvant influencer la réponse du réflexe-H après l'exercice. Par exemple, chez des animaux sains, il a été suggéré que ces afférences exercent un rétrocontrôle au niveau spinal et supraspinal, induisant une inhibition des réflexes somatiques au cours et après une fatigue induite électriquement (Pettorossi *et al.*, 1999; Kalezic *et al.*, 2004). Ces résultats sont confirmés chez l'homme où il a fréquemment été montré qu'une fatigue isométrique provoque une baisse du réflexe-H (Duchateau *et al.*, 2002).

D'autres mécanismes pourraient être impliqués tels qu'une modification de l'influence des voies motrices descendantes, potentiellement altérées par l'ischémie et également connues pour moduler l'activation motoneuronale. Par ailleurs, comme il a été mentionné plus haut, les afférences des groupes III et IV sont les seuls à être activées après un exercice fatigant. Il semble donc peu probable que les afférences mécanosensibles soient impliquées dans la régulation du réflexe-H post-exercice. De même, une perturbation de la régulation du réflexe-H *via* les afférences en provenance des muscles hétéronymes devrait être exclue dans notre étude. En effet, nous avons sectionné les nerfs des muscles synergiques et antagonistes du *triceps brachii* afin d'éviter leurs influences durant l'acquisition du réflexe-H. Les mécanismes impliquant les autres muscles ne contribuent donc pas à ajuster la boucle sensorimotrice après l'exercice.

La réponse du réflexe-H suite à l'exercice retrouve rapidement des valeurs de base en une semaine post-chirurgie, montrant que les mécanismes sous-tendant les adaptations au niveau spinal évoluent très vite. Cependant, rappelons que la fatigue précoce est toujours

présente à J7 durant l'exercice. Une des explications à ce résultat peut être liée à une atrophie musculaire et/ou à une modification de la myotypologie du *triceps brachii*, contrairement à J1 où ces changements myotypologiques semblent trop prématurés. D'après l'étude de Chang et al., les muscles des animaux MCAo-r (1 heure d'occlusion) subissent une perte de la masse musculaire 1 semaine après l'occlusion affectant aussi bien les fibres musculaires de type II que les fibres de type I (Chang *et al.*, 2010). La myotypologie est connue pour influencer la réponse des afférences métabosensibles (davantage présentes sur les fibres musculaires de type II). Ainsi, l'activité des afférences métabosensibles pourrait encore être perturbée soit par une diminution de la sensibilité et/ou la quantité de leurs récepteurs mais également au niveau leur intégration dans la moelle épinière.

### ***Les déficits fonctionnels sont maintenus durant la phase aigüe post-MCAo-r.***

Le score neurologique montre bien que les comportements globaux sont similaires entre les animaux lésés. Les résultats du test de suspension par la queue montrent que l'ischémie cérébrale induit bien une asymétrie motrice dans notre étude. Les animaux lésés se redressent exclusivement du côté gauche durant 7 jours suivant la chirurgie MCAo-r, sans aucun signe de récupération. Notre étude est la première à utiliser ce test après une occlusion de l'ACM de 2 heures. Dans les travaux de Borlongan et al., l'ischémie d'une heure réalisée au niveau de l'hémisphère droit induit une orientation préférentielle à gauche qui reste stable (pour 85 % des essais de 1 jour à 2 mois post MCAo-r), ce qui est similaire avec notre étude (Borlongan & Sanberg, 1995; Borlongan *et al.*, 1998). Pour une ischémie de 30 min, l'orientation des redressements reste préférentiellement à gauche mais elle peut être inférieure à 75 % des essais (Chen *et al.*, 2008). Il semblerait donc que la durée de l'occlusion de l'ACM influence l'importance de l'asymétrie motrice évaluée à partir de ce test.



Les animaux lésés montrent de fortes difficultés à grimper et saisir les barreaux de l'échelle inclinée avec la patte antérieure gauche surtout durant les 4 premiers jours post-MCAo-r mais la récupération reste incomplète. Une étude précédente montre également une baisse de réussite (53,4 % d'erreurs) suite à une ischémie de 2 heures comparable à celle que nous avons observé (Aronowski *et al.*, 1996). Plusieurs causes pourraient être à l'origine de ce phénomène tels qu'un déficit de propulsion, de coordination et/ou une altération de la sensibilité de la patte antérieure gauche (proprioception) (Metz & Whishaw, 2009). Cependant, la contribution respective des déficits sensoriels et moteurs est difficilement quantifiable dans ces conditions et reste à éclaircir.

La baisse de force brute produite avec les 2 pattes antérieures a déjà été observée chez des animaux lésés (Erdő *et al.*, 2006; Ishrat *et al.*, 2009; Deshmukh *et al.*, 2011). Cependant, ce résultat est controversé. C'est pourquoi l'analyse de la force est approfondie dans la présente étude en distinguant la production de force de la patte gauche de celle de la patte droite. En effet, nos résultats montrent que la force produite par la patte antérieure gauche diminue tout au long de la semaine post-MCAo-r justifiant partiellement la baisse du rapport G/D mais aussi la baisse de la force produite avec les deux pattes. En parallèle, la force développée par la patte droite va également diminuée, mais tardivement, suggérant ainsi une atteinte plus modérée au niveau de la patte droite. Il est intéressant de noter que les animaux lésés ont des difficultés à agripper la barre de force à son contact avec leur patte gauche, et non avec la patte droite (aucune difficulté avec les 2 pattes réunies). Dans notre étude, la baisse de force de la patte gauche pourrait donc s'expliquer partiellement par un déficit de sensibilité. Par ailleurs, la méthode MCAo-r est connue pour ne pas entraîner des lésions directes du cortex moteur mais plutôt des structures impliquées dans la régulation de l'activité motrice comme le striatum et le thalamus (Gharbawie & Whishaw, 2006; Kleim *et al.*, 2007).

Il est donc suggéré que la perturbation de la commande motrice volontaire semblerait davantage liée à une altération du versant sensoriel plutôt que du versant moteur.

Les animaux lésés montrent une incapacité à se maintenir en équilibre durant les 2 jours qui suivent l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne. Ils se penchent systématiquement sur la gauche entraînant un déséquilibre important. Nos résultats nous permettent d'apprécier la récupération progressive de l'équilibre statique à partir du 4<sup>ème</sup> jour post-chirurgie qui reste néanmoins incomplète au bout d'une semaine. Ceci semble en contradiction avec plusieurs études qui considèrent que ce test n'est pas assez sensible pour détecter des différences neurologiques après une ischémie cérébrale (Aronowski *et al.*, 1996; Zausinger *et al.*, 2000). Une des raisons qui pourrait expliquer cette différence pourrait être associée à la modification méthodologique apportée dans notre étude. Nous avons laissé un espace de 5 cm entre les 2 poutres afin que les animaux n'utilisent pas le tronc pour s'équilibrer, ce qui biaiserait fortement les résultats. À ce jour, ce test n'est donc toujours pas standardisé mais la modification apportée pourrait être un élément à considérer dans les études futures. À notre avis, ce test devrait être davantage étudié pour optimiser l'évaluation des déficits vestibulomoteurs induits par une ischémie cérébrale.

### ***Caractérisation des déficits posturaux suite à l'ischémie cérébrale à partir du DWB : une nouvelle méthode évaluant la répartition pondérale***

Les altérations posturales causées par une ischémie cérébrale sont habituellement évaluées à partir de tests tels que l'observation de la position des pattes antérieures lorsque l'animal est suspendu par la queue et le score neurologique (de Vries *et al.*, 2011). À notre connaissance, la répartition pondérale n'a jamais été quantifiée directement suite à une ischémie cérébrale chez le rat, bien que les troubles posturaux liés à une asymétrie de la répartition pondérale au niveau membres inférieurs soient fréquemment observés chez

l'Homme (Pérennou & Bronstein, 2005; De Nunzio *et al.*, 2014). Il est alors essentiel de pouvoir identifier précisément ce type de déficits dans l'expérimentation animale pour mieux comprendre les déficits et leur évolution.

L'utilisation du DWB nous a permis de mettre en évidence, après observation des rats lors de l'enregistrement, une augmentation du temps passé sur 3 pattes chez les animaux MCAo. Ce résultat pourrait être associé à une moindre sollicitation de la patte antérieure gauche pour maintenir la position statique. Ce phénomène est possible si l'animal présente une héli-négligence de la patte controlatérale, caractéristique d'une occlusion cérébrale, mais nous ne pouvons le confirmer ici (Carli *et al.*, 1985). D'autre part, nos animaux lésés ne présentent pas une asymétrie de la répartition pondérale au niveau des pattes antérieures et postérieures. Ceci est en désaccord avec les observations faites chez l'Homme où une asymétrie est observée au niveau des membres inférieurs (Pérennou & Bronstein, 2005). Malgré le fait que l'occlusion dure 2 h, la parésie des pattes antérieures n'est peut être pas suffisamment sévère pour être détectée par le DWB. Une ischémie permanente pourrait induire des déficits posturaux plus importants. Par ailleurs, la sensibilité des capteurs pourrait être optimisées car ce dispositif est encore en développement. Ainsi, ce nouveau test semble être approprié pour mesurer précisément l'implication des pattes antérieures et postérieures dans les adaptations posturales suite à un traumatisme du SNC contrairement au SWB (*Static weight-bearing*) où seulement la répartition pondérale des pattes postérieures pouvait être évaluée. Par ailleurs, les mesures sont réalisées sur des animaux pouvant se déplacer librement et sans accumulation de fatigue, représentant plus fidèlement les conditions environnementales naturelles et limitant les biais. De plus, un tel système d'enregistrement permet d'obtenir des données objectives permettant d'avoir des résultats reproductibles.

### *Une réduction de l'œdème cérébral pourrait expliquer en partie la récupération fonctionnelle spontanée.*

L'analyse histologique au Crésyl Violet montre que l'étendue de la zone infarctée ne varie pas entre J1 et J7 bien que celle-ci ait tendance à légèrement diminuer entre J1 et J7, confirmant les données observées dans des travaux précédents (Virley *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009). Une zone infarctée plus importante à J1 pourrait être liée à l'œdème cérébral induit par l'ischémie. En effet, nos valeurs IRM indiquent la présence d'un œdème cérébral important 1 jour après la lésion alors que ce dernier diminue 7 jours après la lésion, ce qui est en accord avec plusieurs études précédentes (Lin *et al.*, 1993; Virley *et al.*, 2000). Par ailleurs, nous suggérons que la réduction de l'œdème cérébral pourrait être en partie à l'origine de la récupération fonctionnelle spontanée observée sur certains de nos tests plutôt qu'une diminution de la zone infarctée. En effet, une résorption de l'œdème cérébral diminue la compression des tissus nerveux environnant, permettant à ces derniers de retrouver une activité (Hallett, 2001; Teasell *et al.*, 2005). Cependant, un tel résultat est à prendre avec précaution puisque l'analyse IRM n'a été réalisée que sur deux animaux seulement.

### 5.5 Conclusion de l'étude n° 1 et ouverture sur le chapitre II

À notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence une perturbation de l'inhibition des réflexes somatiques suite à un exercice fatigant chez des animaux ayant subi une ischémie cérébrale. Les adaptations neuromusculaires dans la phase aigüe devraient être plus étudiées car c'est une période déterminante pour la récupération fonctionnelle. La méthode MCAo-r paraît pertinente pour évaluer les adaptations neuromusculaires dans cette période. La voie réflexe n'est pas modifiée au repos alors que l'amplitude du réflexe-H est modifiée suite à l'exercice isométrique. Cette étude confirme donc que l'exercice isométrique peut être utilisé comme un outil de diagnostic révélant des dysfonctions neuromusculaires qui ne sont pas détectées dans des situations de repos. Ajoutez à cela qu'une fatigue précoce du triceps *brachii* est observée après l'exercice isométrique un jour et 7 jours après la lésion.

Ces résultats ouvrent des perspectives de recherche, puisqu'il a été suggéré dans la discussion que la fatigue précoce et la modulation de la réponse du réflexe-H peuvent résulter d'une perturbation de l'action des afférences métabosensibles originaires du muscle en activité chez les animaux lésés. Cependant, nous n'avons pas montré directement le rôle de ces afférences sur les voies réflexes dans le cadre de l'ischémie cérébrale. Cette hypothèse sera testée dans le chapitre suivant où la réponse des afférences musculaires métabosensibles et leur action régulatrice dans la moelle épinière et le thalamus (qui est un centre d'intégration important des informations sensorielles) seront mesurées dans la phase aigüe de l'ischémie cérébrale.

## Références

- Adams RW, Gandevia SC & Skuse NF (1990). The distribution of muscle weakness in upper motoneuron lesions affecting the lower limb. *Brain J Neurol* **113**, 1459–1476.
- Adreani CM, Hill JM & Kaufman MP (1997). Responses of group III and IV muscle afferents to dynamic exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **82**, 1811–1817.
- Akhtar M, Pillai K & Vohora D (2008). Effect of thioperamide on oxidative stress markers in middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia in rats. *Hum Exp Toxicol* **27**, 761–767.
- Alvarez-Buylla A, Ling C-Y & Kirn JR (1990). Cresyl violet: A red fluorescent Nissl stain. *J Neurosci Methods* **33**, 129–133.
- Amann M, Blain GM, Proctor LT, Sebranek JJ, Pegelow DF & Dempsey JA (2011). Implications of group III and IV muscle afferents for high-intensity endurance exercise performance in humans: Muscle afferents, peripheral fatigue and endurance exercise. *J Physiol* **589**, 5299–5309.
- Aronowski J, Samways E, Strong R, Rhoades HM & Grotta JC (1996). An Alternative Method for the Quantitation of Neuronal Damage After Experimental Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats: Analysis of Behavioral Deficit. *J Cereb Blood Flow Metab* **705–713**.
- Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME & Lo EH (2000). Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1681–1689.
- Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME & Lo EH (2001). Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **21**, 7724–7732.
- Balkaya M, Kröber JM, Rex A & Endres M (2013). Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **33**, 330–338.
- Batchelor FA, Mackintosh SF, Said CM & Hill KD (2012). Falls after stroke. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc* **7**, 482–490.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL & Bartkowski HM (1986). Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* **17**, 1304–1308.
- Benedek A, Móricz K, Jurányi Z, Gigler G, Lévy G, Hársing LG, Mátyus P, Szénási G & Albert M (2006). Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* **1116**, 159–165.
- Bhandari U & Ansari Mn (2008). Protective effect of aqueous extract of *Embelia ribes* fruits in middle cerebral artery occlusion-induced focal cerebral ischemia in rats. *Indian J Pharmacol* **40**, 215.
- Biernaskie J, Szymanska A, Windle V & Corbett D (2005). Bi-hemispheric contribution to functional motor recovery of the affected forelimb following focal ischemic brain injury in rats. *Eur J Neurosci* **21**, 989–999.
- Bigland-Ritchie B, Furbush F & Woods JJ (1986). Fatigue of intermittent submaximal voluntary contractions: central and peripheral factors. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **61**, 421–429.
- Bigland-Ritchie B & Woods JJ (1984). Changes in muscle contractile properties and neural control during human muscular fatigue. *Muscle Nerve* **7**, 691–699.
- Billinger SA, Gajewski BJ, Guo LX & Kluding PM (2009). Single limb exercise induces femoral artery remodeling and improves blood flow in the hemiparetic leg poststroke. *Stroke J Cereb Circ* **40**, 3086–3090.
- Billinger SA, Matlage AE, Ashenden AL, Lentz AA, Harter G & Rippee MA (2012). Aerobic exercise in subacute stroke improves cardiovascular health and physical performance. *J Neurol Phys Ther JNPT* **36**, 159–165.
- Block F, Dihné M & Loos M (2005). Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion. *Prog Neurobiol* **75**, 342–365.
- Borlongan CV, Hida H & Nishino H (1998). Early assessment of motor dysfunctions aids in successful occlusion of the middle cerebral artery. *Neuroreport* **9**, 3615–3621.
- Borlongan CV & Sanberg PR (1995). Elevated body swing test: a new behavioral parameter for rats with 6-

- hydroxydopamine-induced hemiparkinsonism. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **15**, 5372–5378.
- Broughton BRS, Reutens DC & Sobey CG (2009). Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. *Stroke* **40**, e331–e339.
- Brouns R & De Deyn PP (2009). The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* **111**, 483–495.
- Canning CG, Ada L & O'Dwyer N (1999). Slowness to develop force contributes to weakness after stroke. *Arch Phys Med Rehabil* **80**, 66–70.
- Capaday C & Stein RB (1986). Amplitude modulation of the soleus H-reflex in the human during walking and standing. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **6**, 1308–1313.
- Carli M, Evenden JL & Robbins TW (1985). Depletion of unilateral striatal dopamine impairs initiation of contralateral actions and not sensory attention. *Nature* **313**, 679–682.
- Carmel JB & Martin JH (2014). Motor cortex electrical stimulation augments sprouting of the corticospinal tract and promotes recovery of motor function. *Front Integr Neurosci* **8**, 51.
- Carmichael ST (2005). Rodent models of focal stroke: Size, mechanism, and purpose. *NeuroRX* **2**, 396–409.
- Carrera E & Tononi G (2014). Diaschisis: past, present, future. *Brain* **137**, 2408–2422.
- Cenci MA, Wishaw IQ & Schallert T (2002). Opinion: Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* **3**, 574–579.
- Chang H-C, Yang Y-R, Wang PS, Kuo C-H & Wang R-Y (2010). Effects of insulin-like growth factor 1 on muscle atrophy and motor function in rats with brain ischemia. *Chin J Physiol* **53**, 337–348.
- Chen J-R, Cheng G-Y, Sheu C-C, Tseng G-F, Wang T-J & Huang Y-S (2008). Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke. *J Anat* **213**, 249–258.
- Cherry JD, Olschowka JA & O'Banion M (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* **11**, 98.
- Choi DW & Rothman SM (1990). The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* **13**, 171–182.
- Cho S-H & Lee J-H (2013). Comparison of the Amplitudes of the H-reflex of Post-stroke Hemiplegia Patients and Normal Adults during Walking. *J Phys Ther Sci* **25**, 729–732.
- Cliffer KD, Tonra JR, Carson SR, Radley HE, Cavnor C, Lindsay RM, Bodine SC & DiStefano PS (1998). Consistent repeated M- and H-Wave recording in the hind limb of rats. *Muscle Nerve* **21**, 1405–1413.
- Cohen LG, Celnik P, Pascual-Leone A, Corwell B, Falz L, Dambrosia J, Honda M, Sadato N, Gerloff C, Catalá MD & Hallett M (1997). Functional relevance of cross-modal plasticity in blind humans. *Nature* **389**, 180–183.
- Constans A, Pin-barre C, Temprado J-J, Decherchi P & Laurin J (2016). Influence of Aerobic Training and Combinations of Interventions on Cognition and Neuroplasticity after Stroke. *Front Aging Neurosci*; DOI: 10.3389/fnagi.2016.00164.
- Corbett D & Nurse S (1998). The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol* **54**, 531–548.
- Corriveau RA, Bosetti F, Emr M, Gladman JT, Koenig JI, Moy CS, Pahigiannis K, Waddy SP & Koroshetz W (2016). The Science of Vascular Contributions to Cognitive Impairment and Dementia (VCID): A Framework for Advancing Research Priorities in the Cerebrovascular Biology of Cognitive Decline. *Cell Mol Neurobiol* **36**, 281–288.
- Cramer SC et al. (2011). Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain* **134**, 1591–1609.
- Crenna P & Frigo C (1987). Excitability of the soleus H-reflex arc during walking and stepping in man. *Exp Brain Res* **66**, 49–60.
- Crone C & Nielsen J (1989). Methodological implications of the post activation depression of the soleus H-reflex in man. *Exp Brain Res* **78**, 28–32.
- Demyanenko S & Uzdensky A (2016). Profiling of Signaling Proteins in Penumbra After Focal Photothrombotic Infarct in the Rat Brain Cortex. *Mol Neurobiol*; DOI: 10.1007/s12035-016-0191-x.
- De Nunzio AM, Zucchella C, Spicciato F, Tortola P, Vecchione C, Pierelli F & Bartolo M (2014). Biofeedback rehabilitation of posture and weightbearing distribution in stroke: a center of foot pressure analysis. *Funct Neurol* **29**, 127–134.
- Desborough JP (2000). The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth* **85**, 109–117.

- Deshmukh A, Patel J, Prajapati A, Vaghela M & Goswami H (2011). Cerebroprotective effects of extract of *Beta vulgaris* (C.) in middle cerebral artery occlusion (MCAO)-induced cerebral ischemia. *Phytotherapy* 138–147.
- Didier J-P (2004). *La plasticité de la fonction motrice*. Springer, Paris; Berlin; Heidelberg.
- Dousset E, Marqueste T, Decherchi P, Jammes Y & Grelot L (2004). Effects of neonatal capsaicin deafferentation on neuromuscular adjustments, performance, and afferent activities from adult tibialis anterior muscle during exercise. *J Neurosci Res* **76**, 734–741.
- Doyle KP, Simon RP & Stenzel-Poore MP (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* **55**, 310–318.
- Dromerick AW & Reding MJ (1995). Functional outcome for patients with hemiparesis, hemihyesthesia, and hemianopsia. Does lesion location matter? *Stroke* **26**, 2023–2026.
- Duchateau J, Balestra C, Carpentier A & Hainaut K (2002). Reflex regulation during sustained and intermittent submaximal contractions in humans. *J Physiol* **541**, 959–967.
- Duchateau J & Hainaut K (1993). Behaviour of short and long latency reflexes in fatigued human muscles. *J Physiol* **471**, 787–799.
- Durukan A & Tatlisumak T (2007). Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* **87**, 179–197.
- Dyer J-O, Maupas E, de Andrade Melo S, Bourbonnais D, Fleury J & Forget R (2009). Transmission in Heteronymous Spinal Pathways Is Modified after Stroke and Related to Motor Incoordination ed. Hochman S. *PLoS ONE* **4**, e4123.
- Edvinsson L & Krause DN (2002). The blood vessel wall: endothelial and smooth muscle cell. In *Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2nd edn., Lippincott Williams & Wilkins, pp. 30–42. L. Edvinsson and D. N. Krause, Philadelphia, PA.
- Edwardson MA & Dromerick A (2016). Ischemic stroke prognosis in adults. Available at: <http://www.uptodate.com/contents/ischemic-stroke-prognosis-in-adults>.
- Erdő F, Berzsenyi P, Németh L & András F (2006). Talampanel improves the functional deficit after transient focal cerebral ischemia in rats. A 30-day follow up study. *Brain Res Bull* **68**, 269–276.
- Freret T, Chazalviel L, Roussel S, Bernaudin M, Schumann-Bard P & Boulouard M (2006). Long-term functional outcome following transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation between brain damage and behavioral impairment. *Behav Neurosci* **120**, 1285–1298.
- Frontera WR, Grimby L & Larsson L (1997). Firing rate of the lower motoneuron and contractile properties of its muscle fibers after upper motoneuron lesion in man. *Muscle Nerve* **20**, 938–947.
- Fuchs DP, Sanghvi N, Wieser J & Schindler-Ivens S (2011). Pedaling alters the excitability and modulation of vastus medialis H-reflexes after stroke. *Clin Neurophysiol* **122**, 2036–2043.
- Gandevia SC (2001). Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev* **81**, 1725–1789.
- Garland SJ & McComas AJ (1990). Reflex inhibition of human soleus muscle during fatigue. *J Physiol* **429**, 17–27.
- Gharbawie OA & Whishaw IQ (2006). Parallel stages of learning and recovery of skilled reaching after motor cortex stroke: “oppositions” organize normal and compensatory movements. *Behav Brain Res* **175**, 249–262.
- Goulart F, Valls-Solé J & Alvarez R (2000). Posture-related changes of soleus H-reflex excitability. *Muscle Nerve* **23**, 925–932.
- Gozariu M, Roth V, Keime F, Le Bars D & Willer JC (1998). An electrophysiological investigation into the monosynaptic H-reflex in the rat. *Brain Res* **782**, 343–347.
- Grabowski M, Brundin P & Johansson BB (1993). Paw-reaching, sensorimotor, and rotational behavior after brain infarction in rats. *Stroke* **24**, 889–895.
- Gupta YK & Briyal S (2004). Animal models of cerebral ischemia for evaluation of drugs. *Indian J Physiol Pharmacol* **48**, 379–394.
- Hafer-Macko CE, Ryan AS, Ivey FM & Macko RF (2008). Skeletal muscle changes after hemiparetic stroke and potential beneficial effects of exercise intervention strategies. *J Rehabil Res Dev* **45**, 261–272.
- Hallett M (2001). Plasticity of the human motor cortex and recovery from stroke. *Brain Res Brain Res Rev* **36**, 169–174.



- Hankey GJ, Jamrozik K, Broadhurst RJ, Forbes S & Anderson CS (2002). Long-term disability after first-ever stroke and related prognostic factors in the Perth Community Stroke Study, 1989-1990. *Stroke* **33**, 1034–1040.
- Haouzi P, Hill JM, Lewis BK & Kaufman MP (1999). Responses of group III and IV muscle afferents to distension of the peripheral vascular bed. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **87**, 545–553.
- HAS (2015). Prévention vasculaire après un infarctus cérébral ou un accident ischémique transitoire. *Haute Aut Santé*. Available at: [http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-09/avc\\_argumentaire.pdf](http://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/2014-09/avc_argumentaire.pdf).
- Heiss W-D (2010). The concept of the penumbra: can it be translated to stroke management?: Reviews. *Int J Stroke* **5**, 290–295.
- Hunter AJ, Mackay KB & Rogers DC (1998). To what extent have functional studies of ischaemia in animals been useful in the assessment of potential neuroprotective agents? *Trends Pharmacol Sci* **19**, 59–66.
- Hwang I-S, Lin C-F, Tung L-C & Wang C-H (2004). Responsiveness of the H reflex to loading and posture in patients following stroke. *J Electromyogr Kinesiol* **14**, 653–659.
- Ishrat T, Sayeed I, Atif F & Stein DG (2009). Effects of progesterone administration on infarct volume and functional deficits following permanent focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* **1257**, 94–101.
- Ivey FM, Macko RF, Ryan AS & Hafer-Macko CE (2005). Cardiovascular health and fitness after stroke. *Top Stroke Rehabil* **12**, 1–16.
- Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A & Li G (2013). Role of Inflammation and Its Mediators in Acute Ischemic Stroke. *J Cardiovasc Transl Res* **6**, 834–851.
- Jones TA & Adkins DL (2015). Motor System Reorganization After Stroke: Stimulating and Training Toward Perfection. *Physiology* **30**, 358–370.
- Kalezic I, Pilyavskii A., Maisky V., Kostyukov A., Windhorst U & Johansson H (2004). Distinctive pattern of c-fos expression in the feline cervico-lumbar spinal cord after stimulation of vanilloid receptors in dorsal neck muscles. *Neurosci Lett* **364**, 94–97.
- Khaja AM & Grotta JC (2007). Established treatments for acute ischaemic stroke. *Lancet Lond Engl* **369**, 319–330.
- Kleim JA, Boychuk JA & Adkins DL (2007). Rat models of upper extremity impairment in stroke. *ILAR J Natl Res Counc Inst Lab Anim Resour* **48**, 374–384.
- Kniffki KD, Schomburg ED & Steffens H (1981). Synaptic effects from chemically activated fine muscle afferents upon alpha-motoneurons in decerebrate and spinal cats. *Brain Res* **206**, 361–370.
- Knikou M (2008). The H-reflex as a probe: Pathways and pitfalls. *J Neurosci Methods* **171**, 1–12.
- Kober F, Duhamel G & Cozzone PJ (2008). Experimental comparison of four FAIR arterial spin labeling techniques for quantification of mouse cerebral blood flow at 4.7 T. *NMR Biomed* **21**, 781–792.
- Koceja DM, Markus CA & Trimble MH (1995). Postural modulation of the soleus H reflex in young and old subjects. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Mot Control* **97**, 387–393.
- Kudo M, Aoyama A, Ichimori S & Fukunaga N (1982). An animal model of cerebral infarction. Homologous blood clot emboli in rats. *Stroke* **13**, 505–508.
- Lamy J-C, Iglesias C, Lackmy A, Nielsen JB, Katz R & Marchand-Pauvert V (2008). Modulation of recurrent inhibition from knee extensors to ankle motoneurons during human walking: Recurrent inhibition during walking. *J Physiol* **586**, 5931–5946.
- Lassen NA (1959). Cerebral blood flow and oxygen consumption in man. *Physiol Rev* **39**, 183–238.
- Laurin J, Dousset E & Decherchi P (2010). Modulation of the spinal excitability by muscle metabosensitive afferent fibers. *J Neurosci Res* n/a – n/a.
- Laurin J, Pertici V, Dousset E, Marqueste T & Decherchi P (2015). Group III and IV muscle afferents: Role on central motor drive and clinical implications. *Neuroscience* **290**, 543–551.
- Lawrence ES, Coshall C, Dundas R, Stewart J, Rudd AG, Howard R & Wolfe CD (2001). Estimates of the prevalence of acute stroke impairments and disability in a multiethnic population. *Stroke* **32**, 1279–1284.
- Lee S-U, Kim D-Y, Park S-H, Choi D-H, Park H-W & Han TR (2009). Mild to moderate early exercise promotes recovery from cerebral ischemia in rats. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol* **36**, 443–449.
- Leśniak M, Bak T, Czepiel W, Seniów J & Członkowska A (2008). Frequency and prognostic

- value of cognitive disorders in stroke patients. *Dement Geriatr Cogn Disord* **26**, 356–363.
- Levin MF, Kleim JA & Wolf SL (2008). What Do Motor “Recovery” and “Compensation” Mean in Patients Following Stroke? *Neurorehabil Neural Repair* **23**, 313–319.
- Liang JN & Brown DA (2015). Impaired H-Reflex Gain during Postural Loaded Locomotion in Individuals Post-Stroke ed. Lebedev MA. *PLOS ONE* **10**, e0144007.
- Lin TN, He YY, Wu G, Khan M & Hsu CY (1993). Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke* **24**, 117–121.
- Liu Z & Chopp M (2016). Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog Neurobiol* **144**, 103–120.
- Liu Z, Zhang RL, Li Y, Cui Y & Chopp M (2009). Remodeling of the corticospinal innervation and spontaneous behavioral recovery after ischemic stroke in adult mice. *Stroke* **40**, 2546–2551.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S & Cummins R (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**, 84–91.
- Macefield G, Hagbarth KE, Gorman R, Gandevia SC & Burke D (1991). Decline in spindle support to alpha-motoneurons during sustained voluntary contractions. *J Physiol* **440**, 497–512.
- Macefield VG, Gandevia SC, Bigland-Ritchie B, Gorman RB & Burke D (1993). The firing rates of human motoneurons voluntarily activated in the absence of muscle afferent feedback. *J Physiol* **471**, 429–443.
- Macrae M (1992). New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol* **34**, 302–308.
- Marsden DL, Dunn A, Callister R, Levi CR & Spratt NJ (2013). Characteristics of exercise training interventions to improve cardiorespiratory fitness after stroke: a systematic review with meta-analysis. *Neurorehabil Neural Repair* **27**, 775–788.
- Matsuda F, Sakakima H & Yoshida Y (2011). The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol Oxf Engl* **201**, 275–287.
- Menzies SA, Hoff JT & Betz AL (1992). Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* **31**, 100–106; discussion 106–107.
- Metz GA & Wishaw IQ (2009). The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and its Practical Application. *J Vis Exp*; DOI: 10.3791/1204.
- Misiaszek JE & Pearson KG (1997). Stretch of quadriceps inhibits the soleus H reflex during locomotion in decerebrate cats. *J Neurophysiol* **78**, 2975–2984.
- Monga TN, Deforge DA, Williams J & Wolfe LA (1988). Cardiovascular responses to acute exercise in patients with cerebrovascular accidents. *Arch Phys Med Rehabil* **69**, 937–940.
- Motta-Oishi AAP, Magalhães FH & Micolis de Azevedo F (2013). Neuromuscular electrical stimulation for stroke rehabilitation: Is spinal plasticity a possible mechanism associated with diminished spasticity? *Med Hypotheses* **81**, 784–788.
- Murphy TH & Corbett D (2009). Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* **10**, 861–872.
- Nielsen JB, Crone C & Hultborn H (2007). The spinal pathophysiology of spasticity? from a basic science point of view. *Acta Physiol* **189**, 171–180.
- Nour M, Scalzo F & Liebeskind DS (2012). Ischemia-Reperfusion Injury in Stroke. *Interv Neurol* **1**, 185–199.
- Nudo RJ (2006). Plasticity. *NeuroRx J Am Soc Exp Neurother* **3**, 420–427.
- Onyango IG, Lu J, Rodova M, Lezi E, Crafter AB & Swerdlow RH (2010). Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health. *Biochim Biophys Acta* **1802**, 228–234.
- Palmieri RM, Ingersoll CD & Hoffman MA (2004). The hoffmann reflex: methodologic considerations and applications for use in sports medicine and athletic training research. *J Athl Train* **39**, 268–277.
- Pantano P, Formisano R, Ricci M, Piero VD, Sabatini U, Pofi BD, Rossi R, Bozzao L & Lenzi GL (1996). Motor recovery after stroke: Morphological and functional brain alterations. *Brain* **119**, 1849–1857.
- Patejdl R & K. Zettl U (2012). Animal Models in Neurology: Drawbacks and Opportunities. *Curr Pharm Des* **18**, 4443–4452.

- Patel MD, Coshall C, Rudd AG & Wolfe CDA (2002). Cognitive impairment after stroke: clinical determinants and its associations with long-term stroke outcomes. *J Am Geriatr Soc* **50**, 700–706.
- Pérennou D & Bronstein A (2005). Balance disorders and vertigo after stroke: assessment and rehabilitation. In *Recovery after Stroke*, p. 320. Bogousslavsky J, Dobkin B, Cambridge University Press.
- Pettorossi VE, Torre GD, Bortolami R & Brunetti O (1999). The role of capsaicin-sensitive muscle afferents in fatigue-induced modulation of the monosynaptic reflex in the rat. *J Physiol* **515**, 599–607.
- Phadke CP, Robertson CT, Condliffe EG & Patten C (2012). Upper-extremity H-reflex measurement post-stroke: Reliability and inter-limb differences. *Clin Neurophysiol* **123**, 1606–1615.
- Pisa M (1988). Regional specialization of motor functions in the rat striatum: Implications for the treatment of parkinsonism. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **12**, 217–224.
- Popp A, Jaenisch N, Witte OW & Frahm C (2009). Identification of Ischemic Regions in a Rat Model of Stroke ed. Kleinschnitz C. *PLoS ONE* **4**, e4764.
- Rand D, Eng JJ, Liu-Ambrose T & Tawashy AE (2010). Feasibility of a 6-Month Exercise and Recreation Program to Improve Executive Functioning and Memory in Individuals With Chronic Stroke. *Neurorehabil Neural Repair* **24**, 722–729.
- Ren M, Lin Z-J, Qian H, Choudhury GR, Liu R, Liu H & Yang S-H (2012). Embolic middle cerebral artery occlusion model using thrombin and fibrinogen composed clots in rat. *J Neurosci Methods* **211**, 296–304.
- Rochester CL & Mohsenin V (2002). Respiratory complications of stroke. *Semin Respir Crit Care Med* **23**, 248–260.
- Rosenberg GA (1999). Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis* **42**, 209–216.
- Rotto DM & Kaufman MP (1988). Effect of metabolic products of muscular contraction on discharge of group III and IV afferents. *J Appl Physiol Bethesda Md* **64**, 2306–2313.
- Ryan AS, Dobrovolsky CL, Smith GV, Silver KH & Macko RF (2002). Hemiparetic muscle atrophy and increased intramuscular fat in stroke patients. *Arch Phys Med Rehabil* **83**, 1703–1707.
- Schaar KL, Brenneman MM & Savitz SI (2010). Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med* **2**, 13.
- Schallert T (2006). Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx J Am Soc Exp Neurother* **3**, 497–504.
- Schallert T, Upchurch M, Lobaugh N, Farrar SB, Spirduso WW, Gilliam P, Vaughn D & Wilcox RE (1982). Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacol Biochem Behav* **16**, 455–462.
- Schindler-Ivens S, Brown DA, Lewis GN, Nielsen JB, Ondishko KL & Wieser J (2008). Soleus H-reflex excitability during pedaling post-stroke. *Exp Brain Res* **188**, 465–474.
- Schomburg ED, Steffens H & Kniffki K-D (1999). Contribution of group III and IV muscle afferents to multisensorial spinal motor control in cats. *Neurosci Res* **33**, 195–206.
- Siesjö BK (1988). Acidosis and ischemic brain damage. *Neurochem Pathol* **9**, 31–88.
- Smith WS (2004). Pathophysiology of focal cerebral ischemia: a therapeutic perspective. *J Vasc Interv Radiol JVIR* **15**, S3–S12.
- Søgaard K, Gandevia SC, Todd G, Petersen NT & Taylor JL (2006). The effect of sustained low-intensity contractions on supraspinal fatigue in human elbow flexor muscles: Supraspinal fatigue during submaximal contractions. *J Physiol* **573**, 511–523.
- Sokoloff L (1960). Metabolism of the central nervous system in vivo. In *Handbook of Physiology*, Elsevier., pp. 1843–1864. Field J, Magoun HW, Hall VE, Washington DC.
- van der Staay J, Augstein K-H & Horváth E (1996). Sensorimotor impairments in rats with cerebral infarction, induced by unilateral occlusion of the left middle cerebral artery: strain differences and effects of the occlusion site. *Brain Res* **735**, 271–284.
- Starkey ML, Bleul C, Zorner B, Lindau NT, Mueggler T, Rudin M & Schwab ME (2012). Back seat driving: hindlimb corticospinal neurons assume forelimb control following ischaemic stroke. *Brain* **135**, 3265–3281.
- Stowe AM, Hughes-Zahner L, Barnes VK, Herbelin LL, Schindler-Ivens SM & Quaney BM (2013). A pilot study to measure upper extremity H-reflexes following

- neuromuscular electrical stimulation therapy after stroke. *Neurosci Lett* **535**, 1–6.
- Sun J-H, Tan L & Yu J-T (2014). Post-stroke cognitive impairment: epidemiology, mechanisms and management. *Ann Transl Med* **2**, 80.
- Teasell R, Bayona NA & Bitensky J (2005). Plasticity and reorganization of the brain post stroke. *Top Stroke Rehabil* **12**, 11–26.
- Temprado J-J, Sleimen-Malkoun R, Lemaire P, Rey-Robert B, Retornaz F & Berton E (2013). Aging of sensorimotor processes: a systematic study in Fitts' task. *Exp Brain Res* **228**, 105–116.
- Tomczak CR, Jelani A, Haennel RG, Haykowsky MJ, Welsh R & Manns PJ (2008). Cardiac reserve and pulmonary gas exchange kinetics in patients with stroke. *Stroke J Cereb Circ* **39**, 3102–3106.
- Türeyen K, Vemuganti R, Sailor KA & Dempsey RJ (2004). Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. *J Neurosci Methods* **139**, 203–207.
- Uluç K, Miranpuri A, Kujoth GC, Aktüre E & Başkaya MK (2011). Focal Cerebral Ischemia Model by Endovascular Suture Occlusion of the Middle Cerebral Artery in the Rat. *J Vis Exp*; DOI: 10.3791/1978.
- Verweij BH, Amelink GJ & Muizelaar JP (2007). Current concepts of cerebral oxygen transport and energy metabolism after severe traumatic brain injury. In *Progress in Brain Research*, pp. 111–124. Elsevier. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S007961230661008X> [Accessed November 27, 2016].
- Virley D, Beech JS, Smart SC, Williams SC, Hodges H & Hunter AJ (2000). A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behavior. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* **20**, 563–582.
- de Vries S, Tepper M, Otten B & Mulder T (2011). Recovery of Motor Imagery Ability in Stroke Patients. *Rehabil Res Pract* **2011**, 1–9.
- Wahl F, Allix M, Plotkine M & Boulu RG (1992). Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **23**, 267–272.
- Walton ME, Bannerman DM & Rushworth MFS (2002). The role of rat medial frontal cortex in effort-based decision making. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **22**, 10996–11003.
- Wang-Fischer Y ed. (2009). *Manual of stroke models in rats*. CRC Press, Boca Raton.
- Wang Q, Tang XN & Yenari MA (2007). The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* **184**, 53–68.
- Watts L, Lloyd R, Garling R & Duong T (2013). Stroke Neuroprotection: Targeting Mitochondria. *Brain Sci* **3**, 540–560.
- Whishaw IQ, O'Connor WT & Dunnett SB (1986). The contributions of motor cortex, nigrostriatal dopamine and caudate-putamen to skilled forelimb use in the rat. *Brain J Neurol* **109 ( Pt 5)**, 805–843.
- Yang Y-R, Chang H-C, Wang PS & Wang R-Y (2012). Motor Performance Improved by Exercises in Cerebral Ischemic Rats. *J Mot Behav* **44**, 97–103.
- Yang Y-R, Wang R-Y, Wang PS-G & Yu S-M (2003). Treadmill training effects on neurological outcome after middle cerebral artery occlusion in rats. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol* **30**, 252–258.
- Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H & Schmid-Elsaesser R (2000). Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res* **863**, 94–105.
- Zehr EP (2002). Considerations for use of the Hoffmann reflex in exercise studies. *Eur J Appl Physiol* **86**, 455–468.

# Chapitre II

## **Afférences musculaires métabosensibles et régulation de l'activité motrice suite à l'ischémie cérébrale**

### **Sommaire**

---

- 1. Propriétés des afférences musculaires des groupes III et IV**
  - 2. Régulation des fonctions neuromusculaires par les afférences des groupes III et IV**
  - 3. Étude n°2 : Influence de l'activité des afférences métabosensibles musculaires dans la régulation de l'activité motrice suite à l'ischémie cérébrale chez le rat**
- 

Notre première étude, en accord avec de précédents travaux de la littérature ([Hwang et al., 2004](#); [Lamy et al., 2008](#); [Cho & Lee, 2013](#); [Liang & Brown, 2015](#)), montre qu'il y a une plasticité de la boucle sensorimotrice au niveau de la moelle épinière à la suite d'une ischémie cérébrale ([Pin-Barre et al., 2014](#)). Les afférences métabosensibles (afférences musculaires des groupes III et IV) représenteraient des candidats potentiels pour expliquer la modification de l'activité des réflexes somatiques que nous avons observé après l'exercice isométrique ([Kaufman et al., 1983](#); [Kaufman & Rybicki, 1987](#); [Kalezic et al., 2004a](#)). Ces afférences

représentent les seules afférences musculaires qui continuent d'être actives après un exercice musculaire fatigant en répondant aux variations métaboliques du muscle actif (Adreani *et al.*, 1997). Par ailleurs, elles sont connues pour moduler l'amplitude des réflexes somatiques au cours et après un exercice isométrique fatigant (Pettorossi *et al.*, 1999; Kalezic *et al.*, 2004b; Laurin *et al.*, 2010).

Afin de pouvoir dégager le rôle de ces afférences dans la régulation des réflexes somatiques spinaux après une ischémie cérébrale, il est nécessaire de résumer leurs caractéristiques anatomiques et leurs propriétés dans des conditions physiologiques. Nous décrirons ensuite les zones potentielles de leurs projections dans le SNC et nous verrons qu'à ce propos le thalamus est une région d'intégration probable de ces afférences pouvant être (indirectement) affectée par l'ischémie cérébrale. Enfin, nous envisagerons par la suite le rôle de ces afférences dans la régulation de la fonction neuromusculaire avant de présenter l'étude n°2.

### 1. Propriétés des afférences musculaires des groupes III et IV

#### *1.1 Généralités sur les afférences musculaires des groupes III et IV*

Les fibres afférentes des groupes III et IV représentent plus de 50 % de toutes les afférences musculaires. Les afférences du groupe III (ou fibres sensorielles A $\delta$ ) sont finement myélinisées, de petit diamètre (de 1-16  $\mu\text{m}$ ) et possèdent une vitesse de conduction peu élevée et inférieure à celle des afférences de gros diamètre (2,6  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  à 30  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Erlanger & Gasser, 1924, 1930; Lloyd, 1943). Les afférences du groupe IV, appartenant aux fibres sensorielles C, sont non-myélinisées et de très petit diamètre ( $< 1 \mu\text{m}$ ) (Gasser, 1950; Brock *et al.*, 1951; Paintal, 1967). La vitesse de conduction de l'influx nerveux est donc très lente ( $\leq 2,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Le terme de « fibres afférentes fines » peut être utilisé pour désigner « les afférences des

groupes III et IV ». Par ailleurs, bien qu'originaires des terminaisons nerveuses libres réparties au niveau des muscles et des tendons, ces deux groupes d'afférences ne forment pas une population de fibres homogènes et sont distinguables de part leurs structures et leurs fonctions.

En informant les centres spinaux et supraspinaux des modifications mécaniques, chimiques, thermiques (pouvant être nociceptives et/ou non-nociceptives) du muscle, ces afférences sont impliquées dans l'ajustement de la commande motrice centrale (*e.g.* activation volontaire, activité réflexe) et/ou dans la régulation de l'activité du système nerveux autonome (cardiorespiratoire) lors de l'exercice physique (Mense, 1986; Laurin *et al.*, 2015). Ainsi, la contribution de ces afférences dans les mécanismes de fatigue est de plus en plus étudiés chez des populations saines et pathologiques, aussi bien chez l'Homme que chez l'animal.

### ***1.2 Origines anatomiques des afférences musculaires des groupes III et IV***

#### **1.2.1 Terminaisons nerveuses libres du muscle squelettique**

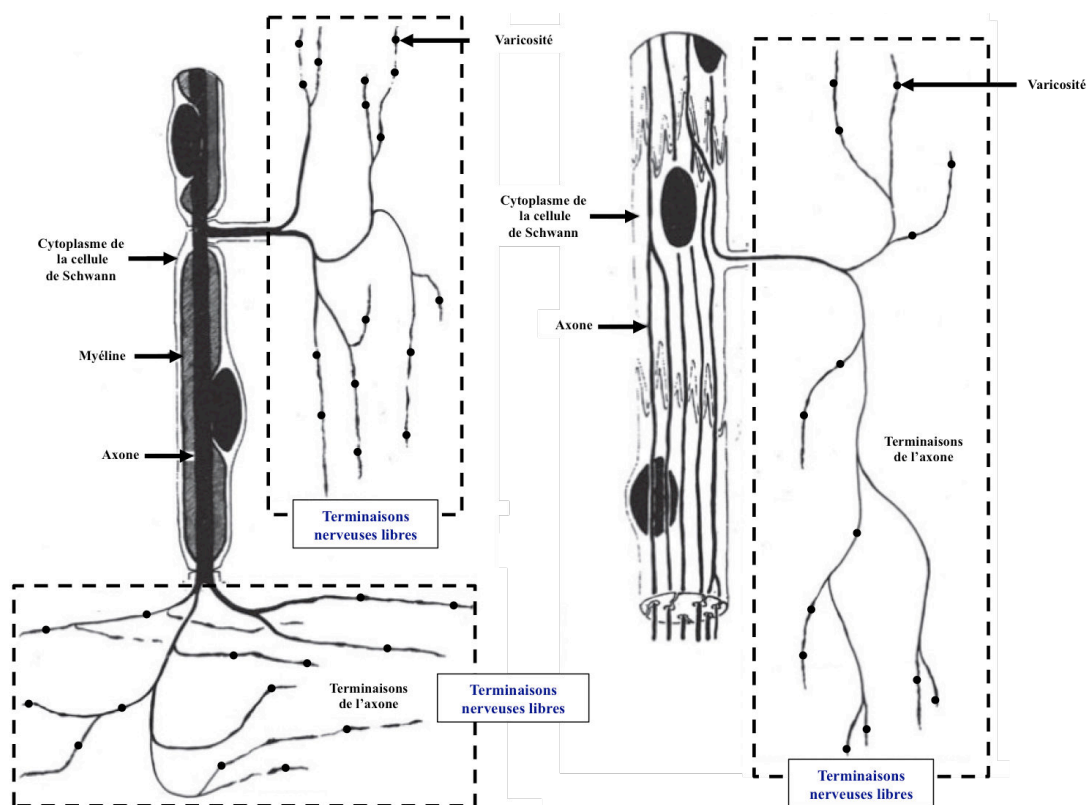
Bien que de nombreux travaux sur le modèle animal aient apportés des connaissances précieuses sur les origines des afférences musculaires des groupes III et IV, certaines informations méritent d'être clarifiées, notamment au niveau des récepteurs composants les terminaisons nerveuses libres.

La plupart des afférences des groupes III et IV sont issues de terminaisons nerveuses libres<sup>1</sup> dont les branches sont non-myélinisées (ou recouvertes d'une seule couche de cellules de Schwann) et composées de petites « varicosités » (du fait de leur ressemblance à des colliers de perles) (Figure 2.1) (Bessou & Laporte, 1961; Mense, 1986). Les stimuli sont

---

<sup>1</sup> Désigne les neurites des neurones sensoriels venant innover leur cible qui ne se finissent pas par une structure histologique particulière.

supposés agir sur ces portions non-myélinisées (Andres *et al.*, 1985). Il a été observé chez le chat que ces terminaisons (ou récepteurs) sont distribuées dans presque tous les types de tissus du muscle squelettique tels que les fibres intrafusales, la capsule de l'organe tendineux et les tissus de la jonction myotendineuse (Stacey, 1969). Cependant, la majorité des terminaisons nerveuses libres sont localisées au niveau du *pérymesium*<sup>1</sup> et de l'adventice des artérioles et des veinules (à l'exception du réseau capillaire), permettant une détection précise des variations mécaniques et chimiques de l'environnement myotendineux (von Düring & Andres, 1990). De manière surprenante, les fibres musculaires elles-mêmes ne reçoivent pas d'innervation directe par les terminaisons nerveuses libres (Reinert *et al.*, 1998). Par ailleurs, un petit nombre de fibres myélinisées du groupe III peuvent provenir des corpuscules de Pacini<sup>2</sup> et des terminaisons secondaires des fuseaux neuromusculaires (Stacey, 1969).



**Figure 2.1 :** Représentation schématique des terminaisons nerveuses libres des afférences myélinisées (gauche) et non-myélinisées (droite) avec leurs varicosités dans les muscles soleus-gastrocnemius du chat [Adaptée de (Stacey, 1969)].

<sup>1</sup> Couches de tissus conjonctifs regroupant les fibres musculaires en faisceaux.

<sup>2</sup> Mécanorécepteurs situés dans le derme et les tissus conjonctifs sous-cutanés dans lesquels les terminaisons nerveuses sont encapsulées.

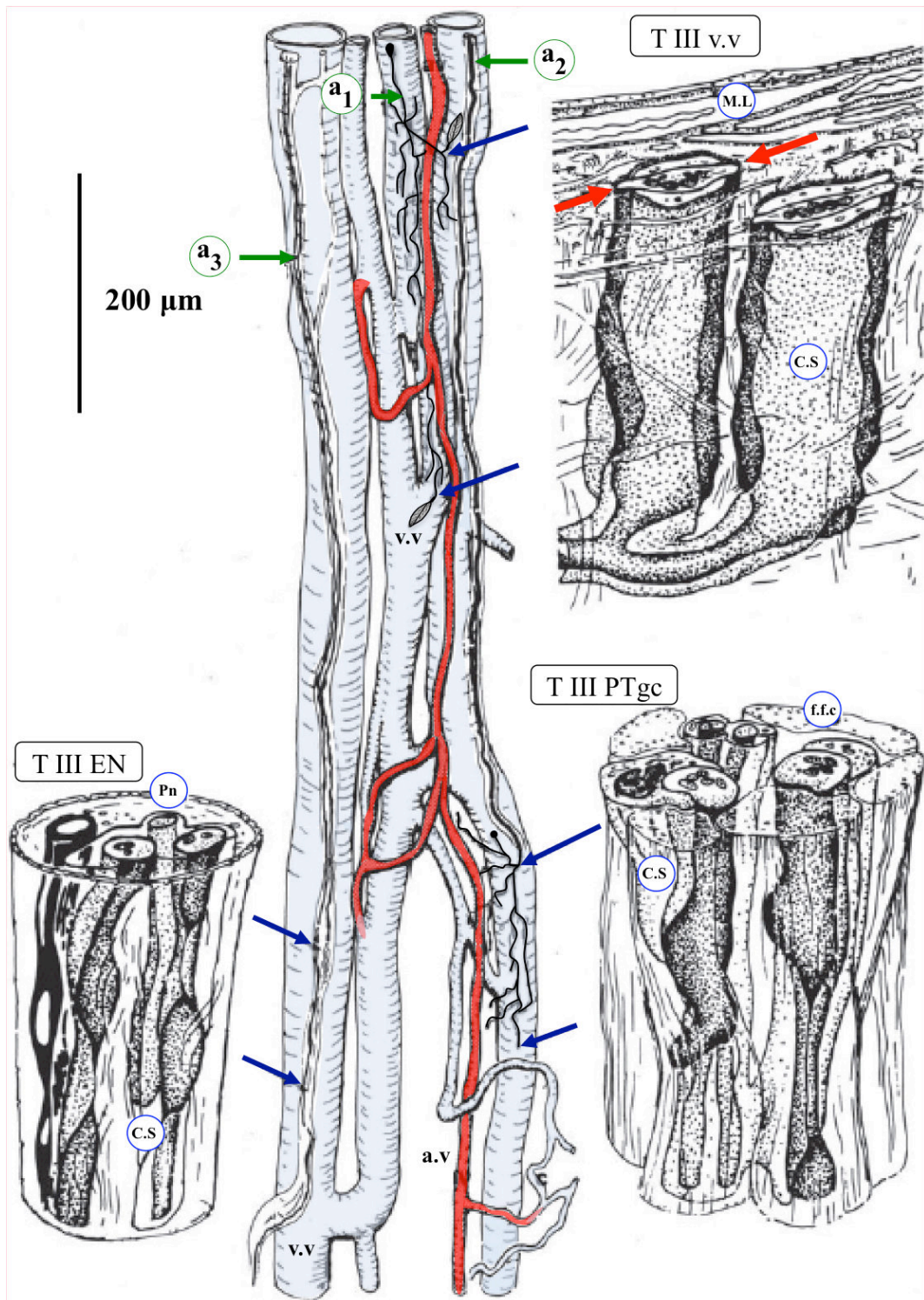


Sur le complexe *soleus-gastrocnemius/tendo calcaneus* (tendon d'Achille) du chat, Andres *et al.* (1985) ont distingué 6 différents types de récepteurs terminaux en fonction de la morphologie et la localisation des terminaisons (Andres *et al.*, 1985). Les fibres du groupe III deviennent non-myélinisées et forment 5 terminaisons différentes qui prennent naissance dans l'adventice des petits vaisseaux, le *perineurium*<sup>1</sup> ou entre les faisceaux des fibres de collagène (Figure 2.2). Ici, les caractéristiques morphologiques de certaines de ces terminaisons révèlent des fonctions mécanoréceptives (Andres *et al.*, 1985). Les varicosités des fibres afférentes fines nociceptives possèdent également des vésicules contenant des neuropeptides (*e.g.* Substance P<sup>2</sup>) (Kruger *et al.*, 2003). Ainsi, les caractéristiques morphologiques de ces terminaisons permettraient de déterminer la spécificité fonctionnelle de chaque récepteur mais aucune preuve directe à ce jour n'indique une distinction entre les terminaisons nerveuses libres des nocicepteurs, thermorécepteurs et mécanorécepteurs. Cependant, l'existence de différents types morphologiques de terminaisons nerveuses libres dans le muscle supporte l'idée que ces récepteurs ne forment pas un groupe homogène et présentent donc des différences fonctionnelles.

---

<sup>1</sup> Couche recouvrant les faisceaux d'axone innervant la même cible au sein d'un nerf.

<sup>2</sup> Une fois libéré, ce neuropeptide induit une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire des vaisseaux sanguins localisés aux alentours des terminaisons nerveuses actives.



**Figure 2.2 :** Reconstruction d'une série complète de sections sur une longueur totale de 1 mm illustrant 3 différentes terminaisons d'afférences du groupe III au niveau du tendon. Les vaisseaux artériels (a.v) et veineux (v.v) sont accompagnés de petits faisceaux de fibres nerveuses dont les axones myélinisés (a<sub>1</sub>, a<sub>2</sub>, a<sub>3</sub>) sont reconstruits. Les segments de 3 différentes terminaisons (amplifiées au maximum ; T III VV, T III PTgc, T III EN) et leurs associations avec les structures tissulaires environnantes sont également représentés. La terminaison spécifique : des a<sub>1</sub> est le type « T III VV » avec 2 terminaisons lancéolées, i.e. forme de feuille (les flèches rouges indiquent les bordures libres), des a<sub>2</sub> est le type T III PTgc dans les tissus conjonctifs du faisceau fibre-nerf-vaisseau et des a<sub>3</sub> est le type T III EN. Les terminaisons se ramifient dans l'endoneurium. La longueur du champ de réception de chaque axone est indiquée par les flèches bleues. (Adapté d'Andres et al, 1985). T : tendon ; Pn : perineurium ; EN : endoneurium ; f.f.c : faisceau de fibres de collagènes ; C.S : cellule de Schwann ; M.L : muscle lisse.

### 1.2.2 Les récepteurs moléculaires

De nombreux travaux, étudiant surtout les nocicepteurs, ont mis en évidence plusieurs groupes de récepteurs moléculaires (ou récepteur membranaires) localisés sur les membranes des terminaisons libres des afférences des groupes III et IV. Les plus connus sont les **TRP** (*Transient Receptor Potential Channels*), les **ASICs** (*Acid Sensing Ion Channels*) et les **P2X** (*Ionotropic Purine Receptors*) sur lesquels les stimuli chimiques, thermiques et mécaniques agissent. Il est à noter ici que les récepteurs "moléculaires" désignent des molécules sur lesquelles se fixent des agents stimulants et/ou qui sont activés par des stimuli mécaniques et chimiques.

Les **TRP** sont des récepteurs ionotropes ligand-dépendant<sup>1</sup> particulièrement sensibles aux stimuli nociceptifs de tous types. Les TRPV1, une sous-catégorie de TRP, sont notamment activées par les protons ( $H^+$ ) et la capsaïcine (Gregory & Sluka, 2014). Une autre sous-catégorie de TRP, les TRPV4 sont particulièrement sensibles aux variations mécaniques importantes (sensibles à la pression locale de haute et basse intensité).

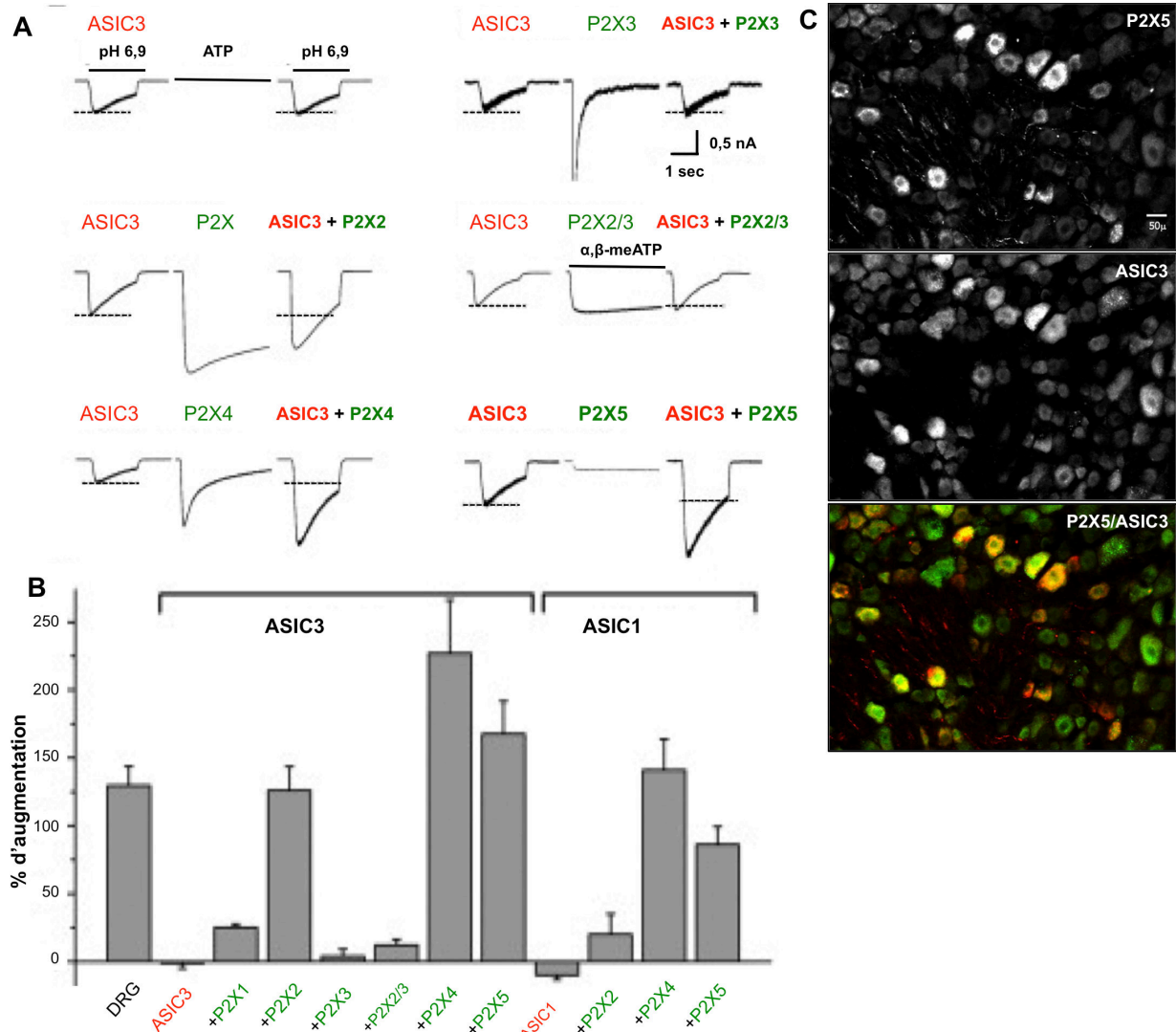
Les **P2X** sont des récepteurs ionotropes ligand-dépendant activés par l'augmentation extracellulaire d'ATP et par la combinaison de lactate, d' $H^+$  et d'ATP (Light *et al.*, 2008). L'activité de ces récepteurs est inhibée malgré l'application des substances activatrices lorsqu'un antagoniste aux P2X comme le PPADS [*Pyridoxal phosphate-6-azo(benzene-2,4-disulfonic acid) tetrasodium salt hydrate*] est appliqué (Kobayashi *et al.*, 2005; Light *et al.*, 2008). Les sous-unités P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub> et P2X<sub>5</sub> sont présentes au niveau des ganglions dorsaux des fibres afférentes fines ainsi que sur les terminaisons nerveuses innervant la tunique de l'adventice (P2X<sub>3</sub>) (Kobayashi *et al.*, 2005; Molliver *et al.*, 2005; Light *et al.*, 2008; Gregory & Sluka, 2014).

---

<sup>1</sup> Protéine membranaire ouvrant un canal ionique suite à sa liaison avec un messenger chimique ou un neurotransmetteur.

Finalement, les ASICs sont des canaux ioniques (cations) activés par l'augmentation extracellulaire d' $H^+$ , reflétant une chute du pH dans le milieu musculaire, et par les températures élevées. La sensibilité des ASICs aux  $H^+$  est augmentée par le lactate. Les sous-unités de ces canaux sont les ASIC1a, ASIC2 et ASIC3 et sont exprimés par les fibres afférentes fines métabosensibles. Tout comme les TRPV1 et les P2X, ils sont localisés sur les branches des terminaisons nerveuses finissant dans la tunique de l'adventice des artères musculaires (Molliver *et al.*, 2005).

Ces trois récepteurs sont activés par des substances libérées durant une contraction intense, quand le muscle est en acidose et/ou en ischémie. Ces derniers agissent de manière synergique en réponse à la production de métabolites et/ou à l'ischémie musculaire durant une contraction. En effet, la libération d'ATP peut potentialiser l'activité des ASICs (ASIC1 et ASIC3) *via* une interaction avec les récepteurs P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> et principalement les P2X<sub>5</sub> (Figure 2.3) (Light *et al.*, 2008; Birdsong *et al.*, 2010). Il semble donc que les ASICs (surtout les ASIC3) soient hautement sensibles à la production d'acide lactique (précisément les  $H^+$ ), reflétant l'utilisation du métabolisme anaérobie par le muscle actif.



**Figure 2.3 : Interaction des P2X et des ASICs après application d'ATP.** (A et B) Ces graphiques montrent les courants ioniques (patch-clamp<sup>1</sup>) de cellules co-transfectées avec l'ADN de différentes sous-catégories de P2X couplées avec celles des ASICs avant et après l'application d'ATP. Les résultats indiquent que 3 des sous-catégories de P2X (i.e. P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>5</sub>) sensibilisent l'activité des ASIC1 et ASIC3 suite à l'administration d'ATP alors que les ASICs seuls ne sont pas activés par l'ATP. À noter que les P2X<sub>5</sub> ne sont pas activés suite à l'application d'ATP mais semblent fonctionner exclusivement en interaction avec les ASICs. (C) D'un point de vue anatomique, il est indiqué que les P2X<sub>5</sub> et ASIC3 sont les sous-catégories les plus co-exprimées (50 % des ASIC3 sont co-exprimés avec les P2X<sub>5</sub>) dans les neurones sensoriels (section de ganglion dorsal au niveau lombaire chez le rat) suggérant que la proximité membranaire de ces 2 récepteurs est nécessaire pour la sensibilisation des ASIC3 [Adaptée de (Birdsong *et al.*, 2010)].

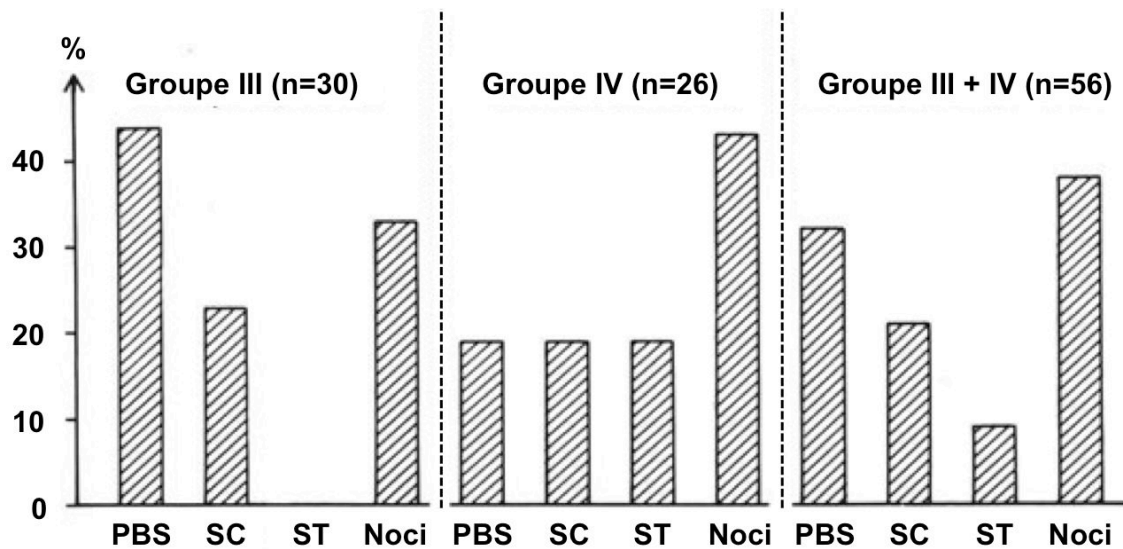
<sup>1</sup> Technique d'électrophysiologie consistant à enregistrer les courants ioniques véhiculés au travers des canaux localisés sur la membranaire cellulaire.

### *1.3 Les activateurs des afférences musculaires des groupes III et IV*

Historiquement, les afférences du groupe IV étaient considérées pour répondre à des stimuli nociceptifs contrairement aux afférences du groupe III (Lim *et al.*, 1964; Paintal, 1967; Mense, 2009). Il a été montré que seulement 40 % des afférences du groupe IV sont activées par des stimuli douloureux (Mense, 1977). Les afférences des groupes III et IV sont particulièrement activées au cours et après un exercice prolongé et/ou intense (*i.e.* isométrique/statique et dynamique) lors duquel les muscles squelettiques libèrent de nombreuses substances métaboliques et/ou subissent des modifications mécaniques et thermiques (McCloskey & Mitchell, 1972; Kumazawa & Mizumura, 1977; Kaufman *et al.*, 1983, 1984b; Rybicki *et al.*, 1985; Mense & Meyer, 1985, 1988; Adreani *et al.*, 1997). La chronologie des événements mécaniques et métaboliques se déroulant dans le muscle au cours d'une contraction a permis de mettre en évidence des propriétés de décharge différentes entre les afférences musculaires des groupes III et IV (Mense & Stahnke, 1983; Kaufman & Rybicki, 1987). Ainsi, les afférences du groupe III semblent être principalement sensibles aux stimuli mécaniques non-proprioceptifs alors que celles du groupe IV répondent essentiellement aux stimuli chimiques. Ces deux groupes d'afférences présentent une grande proportion de fibres sensibles aux stimuli mécaniques, chimiques et thermiques (Mense & Meyer, 1985) (**Figure 2.4**). Enfin, certaines de ces fibres ne sont pas exclusivement sensibles à un seul type de stimulus et possèdent des propriétés polymodales<sup>1</sup> (Kumazawa & Mizumura, 1977). Pour plus de clarté, les différentes propriétés de ces afférences seront abordées séparément.

---

<sup>1</sup> La nature des propriétés réceptives des afférences musculaires des groupes III et IV est toujours discutée. Il est suggéré qu'elles peuvent être sensibles aux stimulus nociceptifs et/ou thermiques et/ou mécaniques et/ou métaboliques soit être sensibles à un seul type de stimuli. Il est donc suggéré que ces afférences peuvent être des fibres sensorielles polymodales ou spécifiques.



**Figure 2.4 :** Exemple de la distribution des différents types de récepteurs parmi les afférences des groupes III et IV dans les muscles soleus-gastrocnemius chez le chat. PBS : unités sensibles à la pression à bas seuil ; SC : unités sensibles à la contraction ; ST : unités sensibles aux variations thermiques ; Noci : unités nociceptives [Adaptée de (Mense & Meyer, 1985)].

### 1.3.1 Réponse des afférences des groupes III et IV aux stimuli mécaniques

Les afférences du groupe III sont davantage mécanosensibles que celles du groupe IV (Kaufman *et al.*, 1983; Rybicki & Kaufman, 1985). En effet, les afférences du groupe III répondent immédiatement et intensément dès le début d'une contraction, caractéristique de leur propriété mécanosensible. La réponse des afférences du groupe III augmente graduellement avec l'augmentation de la force de contraction et est synchronisée avec divers type de contractions oscillantes (*e.g.* twitch à 5 Hz ou contraction tétanique intermittente) (Kaufman *et al.*, 1983; Mense & Stahnke, 1983). Par ailleurs, les afférences du groupe III sont plus sensibles à la production de force statique et dynamique (*i.e.* locomotion évoquée *via* la stimulation de la région locomotrice mésencéphalique du tronc cérébral) ainsi qu'à l'étirement musculaire que celles du groupe IV (Kaufman *et al.*, 1983; Rybicki *et al.*, 1985; Hayes *et al.*, 2009). Finalement, l'injection intra-artérielle de *gadolinium*, un lanthanide trivalent bloquant les mécanorécepteurs des afférences du groupe III, se traduit par une atténuation de la réponse des afférences du groupe III durant la locomotion, lors d'une contraction tétanique ou d'un

étirement tendineux (Yang & Sachs, 1989; Hayes & Kaufman, 2001; Hayes *et al.*, 2009). Ce résultat confirme leur implication en réponse aux stimuli mécaniques.

Les afférences du groupe IV paraissent davantage métabosensibles que celles du groupe III (Haouzi *et al.*, 1999). L'activation des afférences du groupe IV débute généralement après un délai de 5 à 30 s après le début d'une contraction et leur décharge persiste après l'exercice jusqu'à ce que l'accumulation de métabolites dans le muscle se dissipe, alors que les afférences du groupe III restent silencieuses (Haouzi *et al.*, 1999). Les afférences du groupe IV sont préférentiellement activées par les métabolites libérés durant une contraction sous ischémie par rapport aux afférences du groupe III (Kaufman & Rybicki, 1987). Il est tout de même possible d'observer de faibles décharges du groupe IV au début d'une contraction durant la locomotion (Hayes *et al.*, 2009). Cependant, le *gadolinium* n'a aucun effet sur la décharge des afférences du groupe IV en réponse à une contraction statique (Hayes & Kaufman, 2001). Ces résultats indiquent donc que les afférences du groupe IV répondent peu aux stimuli mécaniques non-nociceptifs induits par un exercice statique et dynamique (Mense & Stahnke, 1983). Néanmoins, quelques afférences non-myélinisées déchargent lorsque des stimuli mécaniques nociceptifs sont appliqués au niveau du muscle (Mense & Stahnke, 1983; Kaufman & Rybicki, 1987).

### 1.3.2 Réponse des afférences des groupes III et IV aux stimuli chimiques

Les contraintes mécaniques subies par le muscle à la suite d'une contraction prolongée et/ou intense sont responsables des premières décharges des afférences des groupes III et IV. Cependant, une seconde décharge de ces fibres sensorielles est observée après un délai de quelques secondes, et semble être principalement associée à l'accumulation de métabolites libérés par le muscle et aux variations thermiques locales (Rotto & Kaufman, 1988). Parmi ces métabolites, le  $K^+$ , l'acide lactique [(AL), regroupant le lactate et les  $H^+$ ], l'ATP, les



produits de l'acide arachidonique (prostaglandines et thromboxanes) et la bradykinine (médiateur de l'inflammation) sont des activateurs puissants des afférences des groupes III et IV (Laurin *et al.*, 2015).

Les fibres afférentes stimulées durant une contraction prolongée sont les mêmes que celles qui répondent à l'injection de chlorure de potassium (KCl), un composé chimique ayant des propriétés similaires au  $K^+$  (Mense & Stahnke, 1983; Rybicki *et al.*, 1985). En effet, une grande proportion de ces fibres (88 % des afférences du groupe III et 94 % des afférences du groupe IV) déchargent suite à l'injection de KCl et leur réponse s'intensifie avec l'augmentation de  $[K^+]$  dans le muscle. Il est à noter que les afférences des groupes I et II ne répondent pas à l'injection de KCl qui peut donc être considéré comme un stimulus spécifique des afférences fines.

L'acide lactique, un autre métabolite libéré durant une contraction, contribue également à l'augmentation de la fréquence de décharge des afférences des groupes III et IV (Rotto & Kaufman, 1988). Certains postulent que l'AL est le stimulus le plus puissant des afférences des groupes III et IV (Thimm & Baum, 1987). L'injection d'ion dichloroacétate, diminuant la concentration d'AL dans le muscle, atténue la réponse des afférences du groupe III durant la contraction tétanique et après une fatigue musculaire induite électriquement (Sinoway *et al.*, 1993; Darques *et al.*, 1998). La fréquence de décharge des fibres afférentes s'intensifie avec l'augmentation de la concentration d'AL (Sinoway *et al.*, 1993; Decherchi *et al.*, 1998; Dousset *et al.*, 2004).

L'injection intra-artérielle d' $\alpha,\beta$ -methylene ATP et certains médiateurs de l'inflammation (produits de l'acide arachidonique) peuvent activer environ 50 % des afférences des groupes III et IV d'un muscle donné (Mense & Meyer, 1988; Rotto & Kaufman, 1988; Hanna & Kaufman, 2003). Enfin, la vasodilatation et l'accroissement de la température musculaire intervenant au cours de la contraction pourraient stimuler les

afférences des groupes III et IV comme le montre l'effet de l'injection de substances vasodilatatrices (telles que la papavérine et l'isoprénaline) qui induit une augmentation de leur décharge (Hertel *et al.*, 1976; Haouzi *et al.*, 1999).

### 1.3.3 Sensibilisation des afférences des groupes III et IV à leurs différents stimuli

Plusieurs observations indiquent que la réponse de ces afférences peut être influencée par une sensibilisation<sup>1</sup> de leurs terminaisons nerveuses en fonction de l'état chimique du muscle (Mense, 1986). Cette sensibilité est principalement modulée en présence d'une ischémie musculaire ou dans des conditions pathologiques (*i.e.* traumatismes musculaires, inflammation musculaire, troubles métaboliques) qui modifient donc le seuil d'activation des récepteurs par leurs stimuli.

#### *Influences de diverses substances chimiques sur la sensibilité des afférences mécanosensibles des groupes III et IV*

Plusieurs auteurs indiquent que le seuil d'activation (ou la sensibilité) des fibres afférentes fines est augmentée par des substances inflammatoires durant une contraction statique et dynamique (ces substances sont également des activateurs de ces afférences comme mentionné plus haut). Par exemple, les produits de l'acide arachidonique potentialisent la sensibilité des afférences des groupes III (surtout) et IV à la contraction statique et durant un exercice dynamique évoqué électriquement chez le chat (Rotto *et al.*, 1990b, 1990a; Hayes, 2006). L'injection d'indométacine et d'aspirine (anti-inflammatoires diminuant la synthèse des prostaglandines et des thromboxanes) réduit la réponse de ces afférences au cours de ces mêmes stimulations mécaniques (Adreani & Kaufman, 1998;

---

<sup>1</sup> Condition dans laquelle une substance chimique va potentialiser l'efficacité de l'action d'une autre substance ou d'un autre type de stimulus.

Darques *et al.*, 1998; Hayes, 2006). De même, Hayward *et al.* (1991) démontrent que la fatigue évoquée électriquement augmente la sensibilisation de ces fibres afférentes aux stimuli mécaniques (*e.g.* pression locale et contraction musculaire brève) (Hayward *et al.*, 1991). Cette sensibilisation est d'autant plus importante lorsque la fatigue musculaire est accompagnée par une ischémie bloquant les substances libérées par le muscle (Mense & Stahnke, 1983). Chez l'Homme sain, des conclusions similaires indiquent que les prostaglandines sensibilisent les mécanorécepteurs des muscles durant un exercice manuel (Herr *et al.*, 1999). Pour preuve, la réponse de ces fibres augmente seulement après un délai correspondant à la latence d'accumulation des prostaglandines de type E2 (PGE2) dans le muscle (Middlekauff, 2004).

L'injection intra-artérielle d' $\alpha,\beta$ -methylene ATP présente aussi la faculté de diminuer le seuil d'activation des afférences des groupes III et IV, augmentant ainsi la réponse de l'ergoréflexe<sup>1</sup> évoqué par l'étirement du muscle squelettique. Pour renforcer ces observations, l'injection de PPADS, un antagoniste du récepteur purinergique P2X (récepteur à l'ATP), réduit l'effet sensibilisant de l'ATP sur le réflexe de 78 % (Li & Sinoway, 2002).

### *Influences de diverses substances chimiques sur la sensibilité des afférences métabosensibles des groupes III et IV*

Certaines substances chimiques peuvent sensibiliser l'effet d'autres activateurs chimiques des afférences du groupe III et IV sur leurs réponses. Les PGE2 et les 5-hydroxytryptamine (5-HT ou sérotonine) favorisent l'action stimulante de la bradykinine sur les récepteurs des groupes IV (Mense, 1981). L'action des métabolites sur l'activation des fibres afférentes fines peut être potentialisée par la combinaison de deux ou plusieurs

---

<sup>1</sup> Réflexe d'origine musculaire déclenché par l'activation des afférences des groupes III et IV durant un exercice régulant l'activité cardiovasculaire et respiratoire (Mitchell *et al.*, 1983). La décharge induite par ces afférences au cours d'un exercice physique provoque une élévation des fréquences cardiaque et respiratoire ainsi qu'une hausse de la pression artérielle.

métabolites libérés durant la contraction musculaire (Light *et al.*, 2008). Comme nous l'avons déjà évoqué, il est suggéré que les récepteurs de ces afférences agissent en coopération afin d'augmenter leur sensibilité aux différents métabolites. Par exemple, l'administration individuelle de lactate, d'H<sup>+</sup> ou d'ATP activent les afférences mais seulement à de hautes concentrations, aussi bien dans des conditions *in vivo* qu'*in vitro* (Kaufman & Rybicki, 1987; Rotto & Kaufman, 1988; Sinoway *et al.*, 1993; Hanna & Kaufman, 2003; Light *et al.*, 2008). Dans une étude réalisée *in vitro* chez la souris, la combinaison de lactate, H<sup>+</sup> et d'ATP appliquée directement au niveau des ganglions dorsaux de la région lombaire active plus de 30 % des neurones à des concentrations modestes, allant jusqu'à 50 % à de plus hautes concentrations (Light *et al.*, 2008). Dans ce cadre, le lactate semble potentialiser la réponse des afférences aux H<sup>+</sup> dans des conditions physiologiques. Rappelons que l'ATP, agissant au travers du récepteur P2X<sub>5</sub>, favorise la réponse des ASIC3 aux H<sup>+</sup> (Birdsong *et al.*, 2010). Cette observation est confirmée par les études montrant à la suite de l'injection d'antagonistes aux ASICs et aux P2X, une diminution importante de la réponse à la combinaison lactate/H<sup>+</sup>/ATP ce qui indique la participation de ces récepteurs à la réponse à ces 3 métabolites. Dans notre étude n°2, nous envisagerons d'utiliser des injections avec une combinaison d'activateurs spécifiques afin d'activer plus clairement les afférences des groupes III et IV.

### 2. Régulation des fonctions neuromusculaires par les afférences des groupes III et IV

L'influence de ces fibres afférentes sur la commande motrice centrale est classiquement étudiée durant un exercice fatigant aussi bien sur le modèle animal que chez le sujet sain (Pettorossi *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2000; Gandevia, 2001; Amann *et al.*, 2008, 2011; Amann, 2011). Leur rôle est complexe et encore mal compris car ces afférences peuvent avoir des effets opposés selon leur origine (muscle fléchisseurs ou extenseurs) et leurs projections (muscle homonyme ou hétéronyme). Néanmoins, ces études apportent des preuves directes et indirectes montrant que ces 2 groupes d'afférences contribuent à moduler le recrutement des unités motrices en agissant au niveau spinal et supraspinal.

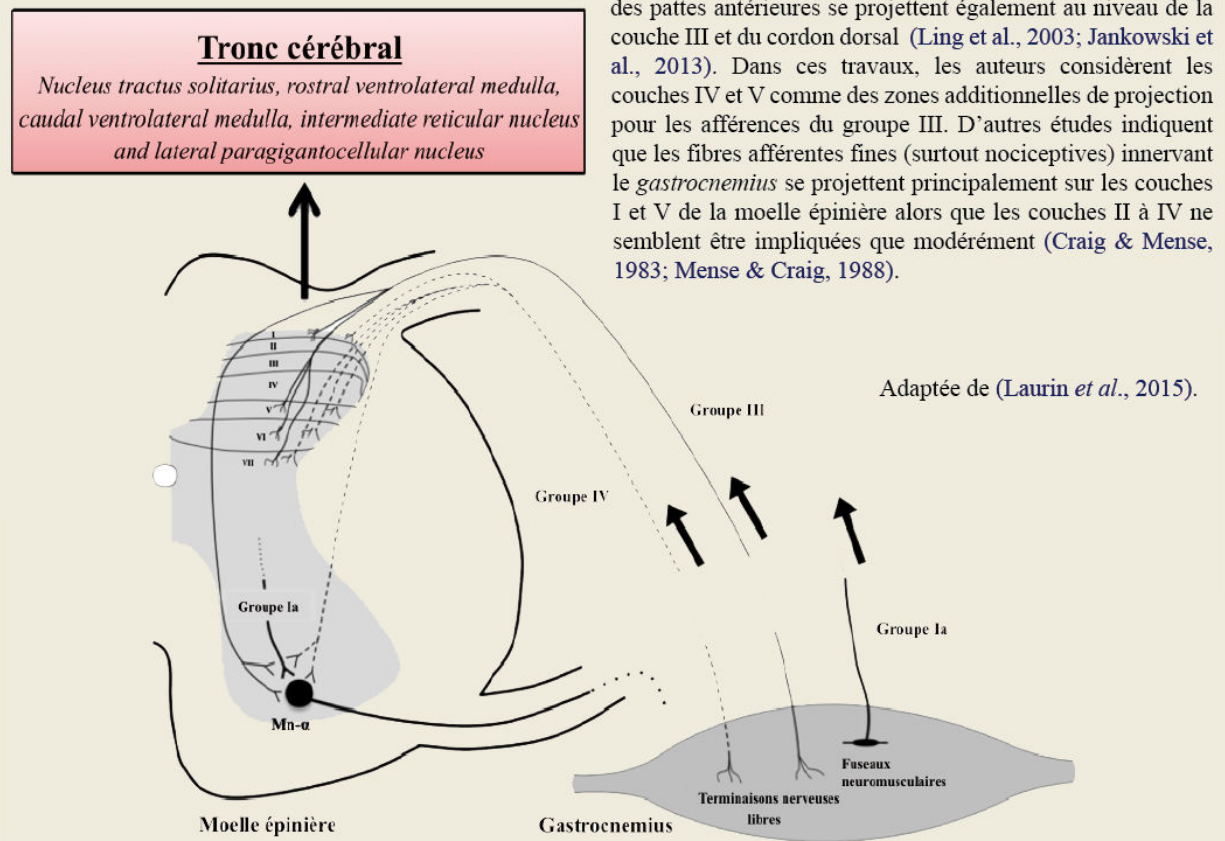
#### *2.1 Projections spinales des fibres afférentes fines*

Plusieurs auteurs démontrent que les afférences des groupes III et IV se projettent sur les couches de Rexed de la corne dorsale de la moelle épinière afin de faire remonter les informations nerveuses par les voies sensorielles ascendantes vers les centres supraspinaux et notamment jusqu'au tronc cérébral (Pomeranz *et al.*, 1968; Degtyarenko & Kaufman, 2000) (**Encadré 2.1**). Il apparaît également que ces fibres afférentes soient directement connectées aux motoneurones- $\alpha$  au niveau post-synaptique mais semblent aussi aboutir au niveau pré-synaptique des afférences de gros diamètre (Ia) (*cf. Figure de l'encadré 2.1 - p.124*) (Kniffki *et al.*, 1981 ; Della Torre *et al.*, 1996). Cette organisation anatomique indique que les afférences des groupes III et IV pourraient intervenir dans la régulation de la boucle sensorimotrice en agissant aussi bien au niveau du muscle homonyme (duquel elles proviennent) qu'au niveau des muscles hétéronymes (synergiques et/ou agonistes).

### Encadré 2.1 | Projections des afférences musculaires des groupes III et IV sur les couches de Rexed

Une fois les récepteurs activés, le message nerveux se propage le long des fibres afférentes des groupes III et IV pour atteindre les différentes couches ou *laminae* de la matière grise de la moelle épinière (appelée couche de Rexed) (Gregory & Sluka, 2014). De là, l'information nerveuse se propage vers des voies ascendantes. Cela permet donc de déterminer avec quelques voies ascendantes ces afférences communicatives. Les entrées sensorielles des fibres afférentes nociceptives des groupes III et IV des muscles *soleus-gastrocnemius* sont localisées dans les couches superficielles (surtout la couche I et à moindre mesure la couche II) de la corne dorsale lombaire chez le chat, le singe et le cobaye (Pomeranz et al., 1968; Foreman et al., 1979; Degtyarenko & Kaufman, 2000a, 2000b, 2000c; Ling et al., 2003). Chez la souris, il a été montré que les afférences du groupe III innervant les muscles des pattes antérieures font synapses dans les couches I et II de la corne dorsale cervicale (Jankowski et al., 2013). De plus, les afférences du groupe IV appartenant au muscle *gastrocnemius* et aux muscles

des pattes antérieures se projettent également au niveau de la couche III et du cordon dorsal (Ling et al., 2003; Jankowski et al., 2013). Dans ces travaux, les auteurs considèrent les couches IV et V comme des zones additionnelles de projection pour les afférences du groupe III. D'autres études indiquent que les fibres afférentes fines (surtout nociceptives) innervant le *gastrocnemius* se projettent principalement sur les couches I et V de la moelle épinière alors que les couches II à IV ne semblent être impliquées que modérément (Craig & Mense, 1983; Mense & Craig, 1988).

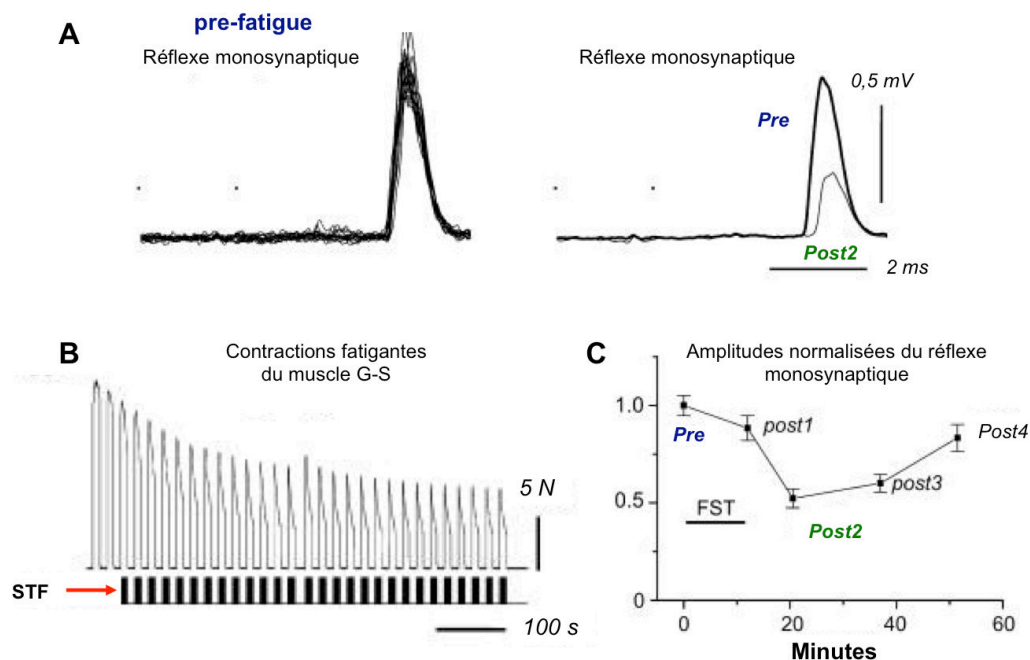


## 2.2 Rôle des afférences des groupes III et IV : Études sur le modèle animal

### 2.2.1 Influence des afférences des groupes III et IV sur le muscle homonyme

Chez l'animal, plusieurs études confirment l'implication des fibres afférentes fines dans la régulation des fonctions neuromusculaires. Il a été montré que l'activation des afférences métabosensibles originaires d'un muscle donné n'aura pas la même action sur l'activité de ce même muscle (muscle homonyme) s'il s'agit d'un muscle fléchisseur ou extenseur. Concernant les fibres afférentes fines d'un muscle fléchisseur, leur activation

chimique induit un effet principalement excitateur sur ses motoneurones- $\alpha$  (Kniffki *et al.*, 1979, 1981a; Windhorst *et al.*, 1997). À l'inverse, les fibres afférentes fines d'un muscle extenseur ont un effet inhibiteur sur les motoneurone- $\alpha$  de ce même muscle (Kniffki *et al.*, 1979, 1981a; Windhorst *et al.*, 1997). Par ailleurs, les afférences des groupes III et IV contribuent à réguler la boucle sensorimotrice au niveau spinal. En effet, durant un exercice fatigant évoqué électriquement, l'activation des fibres afférentes fines module l'amplitude du réflexe somatique (**Figure 2.5**) (Pettorossi *et al.*, 1999; Kalezic *et al.*, 2004a). Celui-ci ne varie plus chez les animaux dont ces afférences ont été détruites (par l'injection de capsaïcine à la naissance) confirmant l'influence des afférences des groupes III et IV sur la régulation du réflexe somatique (Pettorossi *et al.*, 1999). Cependant, les exercices fatigants impliquent de nombreux ajustements nerveux, et pas seulement ceux sollicitant ces afférences, ce qui rend difficile l'évaluation du rôle spécifique des fibres afférentes fines dans la régulation de la boucle sensorimotrice.



**Figure 2.5:** Modifications de l'amplitude du réflexe monosynaptique au niveau du muscle gastrocnemius-soleus chez le chat avant et après contraction fatigante. (A) Superposition de 12 réflexes enregistrés avant (pre ; trait épais) et après (post ; trait fin) fatigue. (B) Stimulation fatigante indiquée par la flèche rouge et force musculaire isométrique associée (au-dessus). (C) Modifications du réflexe monosynaptique en fonction du temps (pre- et post-fatigue). L'amplitude des réflexes post-fatigue est normalisée par rapport à l'amplitude pre. (La période de la STF est indiquée par les barres horizontales). [Adaptée de (Kalezic *et al.*, 2004)]. STF : stimulation fatigante.

Pour préciser le rôle des afférences métabosensibles dans la régulation de l'activité musculaire, l'utilisation d'agents chimiques stimulant exclusivement les afférences des groupes III et IV, comme le KCl, peut fournir de nouvelles informations en s'affranchissant de l'influence des autres types d'afférences. Laurin *et al.* (2010) ont directement montré chez le rat que l'amplitude du réflexe-H du quadriceps est diminuée par l'activation chimique (KCl) des afférences métabosensibles contrairement aux animaux où les afférences des groupes III et IV sont partiellement détruites par la capsaïcine (Laurin *et al.*, 2010). Avec cette méthode d'injection de métabolites, Schomburg *et al.* (1999) ont montré que ces fibres peuvent faciliter, entre autres, l'action inhibitrice des afférences musculaires des groupes Ib sur les motoneurones- $\alpha$  en convergeant vers un interneurone commun permettant une intégration pré-motrice (Schomburg *et al.*, 1999). Ainsi, il est suggéré que leur effet inhibiteur sur le muscle homonyme pourrait être renforcé en facilitant l'action des afférences Ib durant la génération d'un haut niveau de force (*cf. Encadré 1.4 - p.44*).

Dans certaines conditions pathologiques, la contribution des fibres afférentes fines, *via* les interneurones communs, à l'action des autres types d'afférences sur le motoneurone- $\alpha$  pourrait aggraver certains déficits musculaires. En effet, il est postulé qu'une activation répétée des afférences des groupes III et IV en provenance du muscle lésé inhiberait l'activité fusimotrice, ce qui pourrait expliquer la faiblesse ainsi que l'atrophie musculaire observées dans certaines pathologies musculaires (*e.g.* myosite<sup>1</sup>) (Mense & Skeppar, 1991; Mense, 1996).

---

<sup>1</sup> *Inflammation du tissu musculaire.*



### 2.2.2 Influence des afférences des groupes III et IV sur le muscle hétéronyme

Plusieurs preuves indiquent que les afférences des groupes III et IV d'un muscle donné peuvent également agir sur les muscles synergiques et/ou antagonistes durant une contraction intense. En effet, Schomburg *et al.* (1999) montrent que l'activation chimique des afférences métabosensibles des groupes III et IV facilitent l'effet excitateur et inhibiteur des afférences du groupe Ib des muscles antagonistes par des voies polysynaptiques en convergeant sur un même interneurone (Schomburg *et al.*, 1999). Par ailleurs, il apparaît que les afférences du groupe III induisent un effet excitateur et/ou inhibiteur plus important sur le réflexe monosynaptique du muscle hétéronyme (évoqué électriquement à 0,5 Hz) que l'activation des afférences du groupe IV (Schomburg & Steffens, 2002). D'un point de vue anatomique, l'activation de ces 2 groupes d'afférences par l'injection de capsaïcine dans les muscles dorsaux de la nuque déclenche l'augmentation de l'expression du proto-oncogène *c-fos*<sup>1</sup> au niveau des segments cervicaux mais également au niveau des segments lombaires de la moelle épinière chez le chat (Kalezic *et al.*, 2004b). Ceci suggère que ces fibres métabosensibles n'influencent pas seulement l'activité motrice du muscle homonyme mais également celle de muscles plus éloignés.

### 2.3 Rôle des afférences des groupes III et IV : Études chez le sujet sain

Chez l'Homme, l'implication des afférences des groupes III et IV dans la modulation des réflexes somatiques spinaux a été suggérée de façon indirecte durant un exercice fatigant (Bigland-Ritchie *et al.*, 1986; Garland & McComas, 1990; Duchateau & Hainaut, 1993). L'induction d'une ischémie musculaire est une méthode communément utilisée chez l'Homme pour étudier l'influence de ces afférences puisque l'occlusion sanguine permet de maintenir l'activité des afférences métabosensibles *via* l'accumulation de métabolites dans le

---

<sup>1</sup> Facteur de transcription exprimé à la suite d'un signal activateur.

muscle (Kaufman *et al.*, 1984a; Taylor *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2006). Plusieurs auteurs indiquent que l'activation des afférences des groupes III et IV induit une inhibition du réflexe-H des muscles fléchisseurs du poignet et de la cheville durant un exercice fatiguant réalisé avec ischémie musculaire ou suite à une contraction soutenue (Garland & McComas, 1990; Duchateau *et al.*, 2002).

Les afférences des groupes III et IV peuvent également ajuster l'activation motoneuronale en modifiant l'excitabilité de la voie motrice corticospinale. Cependant, leurs actions (inhibitrices ou excitatrices) diffèrent entre les muscles extenseurs et fléchisseurs dans le cas d'un exercice fatiguant (Taylor *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2006). En effet, plusieurs auteurs montrent qu'à la fin d'une contraction fatigante, les potentiels moteurs évoqués cervico-médullaire (CMEPs, stimulant la voie corticospinale) du muscle extenseur fatigué restent diminués lorsque le muscle est maintenu sous ischémie alors que les CMEPs des muscles fléchisseurs fatigués récupèrent à la fin de la contraction malgré l'ischémie (Taylor *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2006). Ces résultats confirment les observations faites chez le chat puisqu'il semblerait également que les afférences des groupes III et IV ont un effet inhibiteur sur les motoneurones- $\alpha$  extenseurs et facilitateurs sur les motoneurones- $\alpha$  fléchisseurs (Kniffki *et al.*, 1981b).

Les afférences des groupes III et IV contribueraient donc à réguler la commande motrice centrale en agissant sur les réflexes somatiques spinaux et sur les voies motrices descendantes. De plus, leurs effets diffèrent en fonction du contexte expérimental et du muscle étudié.

### *2.4 Projections supraspinales des informations en provenance des fibres afférentes fines*

Les projections supraspinales des fibres afférentes fines restent à ce jour encore mal décrites et/ou doivent être clarifiées puisque les observations sont régulièrement controversées. Les principales informations fournies par les travaux expérimentaux sur ce sujet concernent essentiellement les voies nerveuses ascendantes véhiculant les informations nociceptives vers les structures supraspinales qui leurs sont associées. Dans les études utilisant le modèle animal (chat et primate), il est suggéré que la voie spinothalamique (STT) transmet une partie des informations en provenance des afférences des groupes III et IV (Foreman *et al.*, 1979; Craig, 1995). Certaines projections de ces afférences faisant synapses dans la couche I et à moindre mesure dans la couche V de la matière grise spinale remonte par la STT et se finissent au niveau du complexe Ventrobasal ou VB (**Encadré 2.1**) (Hellon & Mitchell, 1975). La STT est surtout connue pour véhiculer les informations nociceptives alors que la voie lemniscale (fibres partant du cordon dorsal) conduit les informations somesthésiques non-nociceptives (Foreman *et al.*, 1979; Craig, 1995). Chez le chat, il a été montré que certains neurones cérébraux des noyaux VPL et noyaux ventro-latéral du thalamus sont modulés par l'activation des afférences nociceptives (Mallart, 1968; Honda *et al.*, 1983; Kniffki & Mizumura, 1983). Le noyau postérieur et le noyau médian du thalamus présentent également des cellules activées par des signaux nociceptifs et certaines fibres de la STT aboutissent dans ces régions thalamiques (Boivie, 1971; Guilbaud *et al.*, 1977; Dong *et al.*, 1978). Il est vraisemblable que certaines projections des influx nerveux originaires des afférences des groupes III et IV non-nociceptives atteignent le thalamus mais à partir de fibres de la STT différentes de celles des afférences nociceptives (Mense, 1986).

### *2.5 Le thalamus ventropostérieur : une zone d'intégration possible des informations sensibles musculaires*

Chez les mammifères vertébrés (et notamment le rat)<sup>1</sup>, le thalamus est une structure sous-corticale complexe formant la plus large partie du diencephale<sup>2</sup> pouvant être subdivisée en deux régions anatomiques : le thalamus dorsal et le thalamus ventral (**Encadré 2.2**) (Groenewegen & Witter, 2004). Le thalamus est considéré comme la structure principale d'intégration de toutes les informations sensorielles (Briggs & Usrey, 2008). Parmi les noyaux du thalamus dorsal, le thalamus ventropostérieur (VPN, *ventral posterior nucleus*) représente le relai principal des influx nerveux sensoriels et peut être sous-divisé en 3 noyaux. Brièvement, le noyau parvocellulaire du noyau médian dorsal est le principal relais des informations gustatives et viscérales. Les noyaux ventro-postéro-latéral (VPL) et ventro-postéro-médial (VPM), aussi connus comme le VB, reçoivent les influx nerveux somatosensoriels des voies ascendantes originaires de la moelle épinière, des noyaux du cordon dorsal et du complexe trégiminal (tronc cérébral). Comme pour le cortex somatosensoriel, les projections atteignant le VPN sont organisées de manière somatotopique. En effet, les projections acheminant les influx nerveux en provenance du tronc et des pattes antérieures et postérieures terminent dans le VPL tandis que le VPM réceptionne essentiellement les informations sensorielles émanant de la tête et particulièrement des vibrisses (représentées en « *barreloids* », cf. Figure de l'encadré 2.2) (Cox et al., 1996). Ainsi, une altération du thalamus pourrait perturber l'intégration des informations nerveuses sensorielles émanant des différentes parties du corps et donc occasionner des troubles sensorimoteurs puisque les versants sensoriel et moteur sont fortement liés.

---

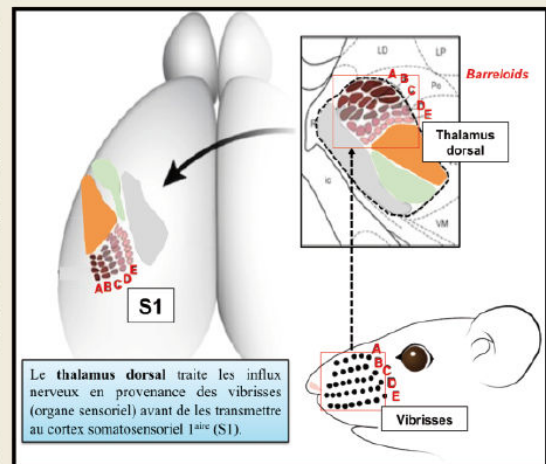
<sup>1</sup> Dans cette partie, nous allons faire référence au thalamus du rat étant que celui-ci est notre modèle d'étude dans les travaux de cette thèse.

<sup>2</sup> En neuroanatomie des vertébrés, cette structure fait référence à un ensemble de substances grises à savoir l'hypothalamus, l'épithalamus, le sous-thalamus et le thalamus.

### Encadré 2.2 | Le thalamus dorsal et ventral chez le rat

Le **thalamus dorsal**, composé de nombreux noyaux dits «noyaux relais», entretient des relations structurelles et fonctionnelles étroites avec plusieurs parties du cortex cérébral, et à moindre mesure, avec d'autres parties du télencéphale tels que les ganglions de la base et l'amygdale. Le thalamus dorsal semble jouer un rôle crucial dans la gestion des nombreuses et diverses informations nerveuses vers le cortex (Groenewegen & Witter, 2004). Les différents noyaux du thalamus dorsal sont caractérisés comme étant soit spécifiques soit non-spécifiques, *i.e.* les noyaux relais spécifiques traitent les informations motrices, sensorielles et associatives alors que les noyaux non-spécifiques encodent les mécanismes de vigilance et d'attention.

Le **thalamus ventral**, également constitué de plusieurs noyaux, est ontogéniquement différent du thalamus dorsal. Contrairement au thalamus dorsal, les noyaux du thalamus ventral, *i.e.* le noyau réticulaire thalamique (Rt) et le noyau géniculé ventro-latéral ne possèdent pas de connexions avec le cortex cérébral mais sont intimement liés avec le thalamus dorsal. En effet, la majorité des fibres afférentes et efférentes entre le thalamus dorsal et le cortex doivent traverser le thalamus ventral (Sherman & Guillery, 2001). Le Rt (localisé en marge du thalamus dorsal séparant ce dernier du cortex cérébral) exerce une action inhibitrice sur les cellules de relais du thalamus dorsal. Ce noyau joue un rôle important pour ajuster la quantité et le patron des décharges que le thalamus dorsal envoie vers le cortex cérébral et donc dans la sélection des informations qui sont transférées.



### 2.6 Conséquences d'une ischémie cérébrale au niveau de l'ACM sur le thalamus

Le thalamus est rarement étudié dans les études expérimentales suite à une ischémie cérébrale corticale alors que cette région est fréquemment affectée chez l'Homme (Tamura *et al.*, 1990). Cette altération du thalamus est régulièrement associée à des déficits sensorimoteurs et cognitifs (Freret *et al.*, 2006; Briggs & Usrey, 2008). L'atteinte du thalamus du côté ipsilésionnel à la suite d'une ischémie cérébrale corticale (ou d'une occlusion de l'ACM) ne peut pas être la conséquence d'une diminution du débit sanguin dans ce territoire puisque l'artère commune postérieure irriguant le thalamus n'est pas directement affectée (Iizuka *et al.*, 1990; Fujie *et al.*, 1990; Dihné *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2004; Justicia *et al.*, 2008). Chez le rongeur, il est montré qu'une altération directe ou indirecte du thalamus suite à une ischémie cérébrale globale, ou une lésion hémorragique, peut induire des troubles de la

sensibilité (e.g. hypersensibilité et/ou une allodynie<sup>1</sup>) au niveau du membre controlésionnel (Yang *et al.*, 2014; Matsuura *et al.*, 2016a, 2016b). Plusieurs mécanismes pouvant être à l'origine de l'altération du thalamus post-ischémique peuvent être proposés.

### *Dégénérescence neuronale*

La dégénérescence neuronale dans le thalamus peut être liée 1) à l'altération d'un neurone (ou axone) induisant une dégradation progressive de l'arborisation terminale et de la gaine de myéline de son axone (dégénérescence antérograde) et 2) à une diminution de l'activité du corps cellulaire, perturbé par l'absence de support trophique lorsque ce dernier est séparé de son axone (dégénérescence rétrograde) (Ross & Ebner, 1990; Iizuka *et al.*, 1990; Fujie *et al.*, 1990; Dihné *et al.*, 2002; Justicia *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2012). En accord avec ces observations, le VPN est particulièrement vulnérable suite à une occlusion de l'ACM puisque de nombreuses connexions existent entre le VPN et le cortex somatosensoriel primaire (Iizuka *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1998; Dihné *et al.*, 2002).

### *Réaction inflammatoire*

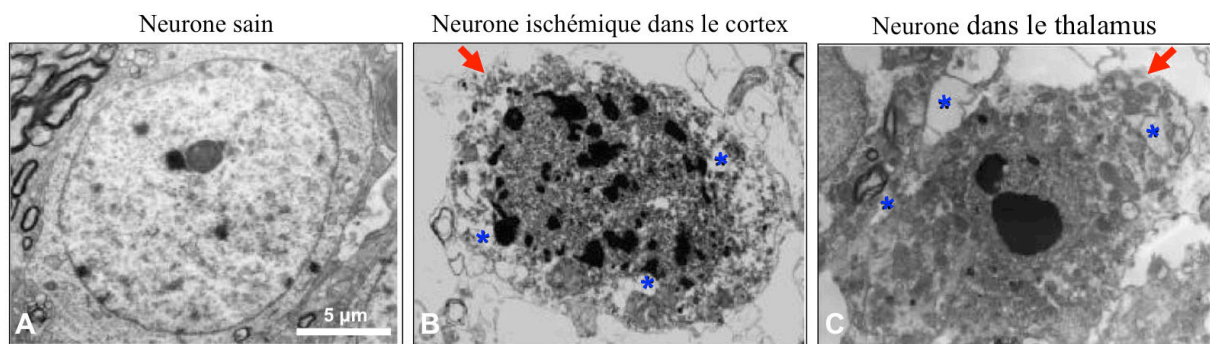
Chronologiquement, la dégénérescence neuronale est associée à une réponse inflammatoire rapide (premiers jours) mais prolongée contribuant à l'établissement de la lésion secondaire (Acarin *et al.*, 1999). Suite à la lésion ischémique causée par la MCAo-r chez le rongeur, une activation astrocytaire et microgiale est observée dans le VPN formant à terme une cicatrice gliale (Watanabe *et al.*, 1998; Dihné *et al.*, 2002; Block *et al.*, 2005; Justicia *et al.*, 2008).

---

<sup>1</sup> Sensation de douleur induite par un stimulus normalement non douloureux.

### Mort neuronale

Le type de mort cellulaire dans le thalamus après une ischémie corticale reste encore controversé. Plusieurs signes indiquent que les neurones affectés présentent des modifications structurales de type apoptotique (*e.g.* condensation de la chromatine, fragmentation du noyau avec corps apoptotiques) et/ou l'expression de médiateurs de l'apoptose (*e.g.* c-Jun, caspase-3) (Soriano *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 2004; Block *et al.*, 2005). Une nécrose liée à l'excitotoxicité dans la région thalamique est également reportée (Ross & Ebner, 1990). Il a récemment été mis en avant que la perte neuronale dans le thalamus peut être consécutive à une mort neuronale d'ordre « hybride » (*i.e.* un neurone mourant présente des caractéristiques à la fois de type nécrotique et apoptotique) (Wei *et al.*, 2004) (Figure 2.6).



**Figure 2.6 :** Exemple de microscopie électronique de cellules suite à une ischémie du cortex. Mise en évidence de l'altération ultrastructurale de neurones individuels dans le cortex ischémique et le thalamus ipsilésionnel. (A) Neurone sain avec un noyau large, un volume cytoplasmique petit et des organelles intactes. (B) Neurone ischémique dans le cortex (3 jours après la lésion) caractérisé par un cytoplasme enflé, des organelles altérées, une membrane détériorée (flèches rouges) et des vacuoles (\*). (C) Neurone thalamique altéré (7 jours après la lésion corticale) avec des caractéristiques nécrotiques (vacuoles, organelles enflées, membranes détériorées) et apoptotiques (condensation de la chromatine) [Adaptée de (Wei *et al.*, 2004)].

À partir d'analyses histologiques (*e.g.* crésyl violet), aucune modification structurelle ni de perte neuronale ne sont mises en évidence dans le thalamus et notamment dans le VPN durant les 3 premiers jours (Iizuka *et al.*, 1990; Watanabe *et al.*, 1999; Dihné *et al.*, 2002). Il faut attendre la fin de la première semaine pour constater une détérioration nucléaire des neurones ainsi qu'une atrophie du cytoplasme (Iizuka *et al.*, 1990; Dihné *et al.*, 2002). Au

même moment, le nombre de neurones thalamiques commence à diminuer dans le thalamus du côté controlésionnel (Watanabe *et al.*, 1999). Une perte neuronale de moitié est atteinte à partir de 2 semaines post-ischémique avec une réduction de 55 % dans le VPN indiquant une mort neuronale retardée des cellules qui se poursuit durant au moins 6 mois (Watanabe *et al.*, 1999; Dihné *et al.*, 2002; Justicia *et al.*, 2008).

### *Atrophie thalamique*

Plusieurs auteurs confirment chez le rongeur, le primate non-humain et l'Homme, qu'une lésion ischémique du cortex induit inévitablement une atrophie sévère et progressive de certains noyaux thalamiques (Tamura *et al.*, 1990; Fujie *et al.*, 1990). Chez le modèle animal, cette atrophie peut débuter au cours des 2 premières semaines (-13 % vs. thalamus controlésionnel) se poursuivant jusqu'à 6 mois (-46 % vs. thalamus controlésionnel) (Fujie *et al.*, 1990). Chez l'Homme, Tamura *et al.* (1990) reporte une diminution graduelle de l'aire du thalamus ipsilésionnel de 3 mois à 1 an post-lésionnelle (Tamura *et al.*, 1990).



En résumé, les afférences des groupes III et IV jouent un rôle inhibiteur sur les réflexes somatiques spinaux pendant et après un exercice fatigant chez le sujet sain (Bigland-Ritchie *et al.*, 1986; Garland & McComas, 1990; Duchateau & Hainaut, 1993). Or leur rôle pourrait être modifié après une ischémie cérébrale, impactant ainsi la régulation de l'activité motrice. En effet, la perturbation des réflexes spinaux somatiques observée post-exercice à la suite d'une ischémie cérébrale pourrait être liée à une modification de l'action de ces afférences métabosensibles (Pin-Barre *et al.*, 2014). Si l'activité de ces afférences est modifiée, il sera alors possible de le détecter en enregistrant soit la réponse des afférences à leurs stimuli chimiques soit la réponse des réflexes somatiques suite à l'activation spécifique de ces afférences. De plus, les influx nerveux en provenance des afférences des groupes III et IV pourraient aboutir dans le VPL du thalamus, qui semble indirectement affecté par une ischémie cérébrale. Une altération de ce noyau thalamique pourrait se traduire par une activation bilatérale de ce dernier suite à une activation sensorielle, comme cela a déjà été observé pour d'autres types de stimulations sensorielles (Murphy & Corbett, 2009). Il paraît important dans un premier temps, de déterminer si l'activation de ces afférences entraîne une réponse dans le VPL (ce qui sera discuté également chez le sujet sain) afin de pouvoir caractériser dans des conditions *in vivo* les altérations thalamiques. En effet, le thalamus pourrait être impliqué dans le traitement des informations sensorielles en provenance des afférences musculaires des groupes III et IV, bien qu'à ce jour cette hypothèse n'ait pas été validée expérimentalement (Foreman *et al.*, 1979; Craig, 1995). L'enregistrement de l'activité thalamique au niveau du VPL après une stimulation de ces afférences est donc un moyen utilisé dans l'étude n°2 pour détecter les modifications éventuelles de l'action des afférences métabosensibles au niveau supraspinal suite à une ischémie cérébrale. Ainsi, dans la continuité de l'étude n°1, nous allons tenter de dégager une altération potentielle de l'action des afférences musculaires des groupes III et IV à divers étages après une ischémie cérébrale.

### 3. Étude n°2

#### **Influence de l'activité des afférences métabosensibles musculaires dans la régulation de l'activité motrice suite à l'ischémie cérébrale chez le rat**

##### ***3.1 Objectif de l'étude n°2***

L'objectif de cette 2<sup>ème</sup> étude est d'évaluer l'activité des afférences musculaires des groupes III et IV après une ischémie cérébrale à l'étage musculaire, spinal et supraspinal afin de cibler précisément la zone où leur action pourrait être altérée. La fréquence de décharge de ces fibres sensorielles est enregistrée suite à l'injection intra-artérielle de plusieurs combinaisons de stimuli spécifiques (AL, KCl, ATP) afin de stimuler davantage ces afférences tout en s'affranchissant de l'activité des afférences musculaires mécanosensibles. La réponse des réflexes somatiques du triceps brachial suite à l'activation spécifique de ces mêmes afférences est également testée. De plus, afin de dégager une éventuelle perturbation de l'action des afférences métabosensibles au niveau supraspinal, la fréquence de décharge des noyaux VPL du thalamus ipsi- et controlatéral est également enregistrée suite à l'injection de ces mêmes combinaisons d'activateurs spécifiques.

##### ***3.2 Matériels & méthodes de l'étude n°2***

###### **3.2.1 Animaux**

Au total, 86 rats mâles Sprague-Dawley (Centre d'élevage Roger JANVIER, Genest-Saint-Isle, France) de 250-270 g ont été conservés dans cette étude. Tous les animaux sont placés dans une cage individuelle en respectant un cycle lumière/obscurité de 12 heures avec nourriture et eau *ad libitum*. La température de la pièce est maintenue à 22°C. Aucun signe

d'hyperactivité, d'anorexie et de prostration n'est observé au cours des différentes phases du protocole. Le poids des animaux est également contrôlé quotidiennement. Ce protocole a été validé par le comité d'éthique local d'Aix-Marseille Université et du CNRS.

### 3.2.2 Protocole expérimental

Ces animaux sont répartis aléatoirement dans les 5 groupes expérimentaux suivant :

1) Témoins (n=28) avec des animaux naïfs de toute chirurgie et dont les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés soit au niveau de la moelle épinière (n=13) soit au niveau du thalamus (n=10). L'expérimentation étant assez longue et les chirurgies assez conséquentes, il n'a pas été possible de réaliser tous les enregistrements sur un même animal lésé, car ils sont plus fragiles. Nous avons donc appliqué la même méthodologie pour tous les groupes d'animaux. Par ailleurs, certains animaux (n=5) complètent le groupe Témoins pour lesquels les enregistrements (réponse des afférences et réflexes somatiques) sont réalisés avant et après l'administration de PPADS au niveau musculaire pour s'assurer de l'activation des afférences métabosensibles par l'injection des agents chimiques.

2) MCAO-J1 (n=10) avec des animaux ayant subi l'occlusion cérébrale et dont les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés au niveau de la moelle épinière 1 jour après la lésion.

3) MCAO-J7 (n=20) avec des animaux ayant subi l'occlusion cérébrale et dont les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés soit au niveau de la moelle épinière (n=14) soit au niveau du thalamus (n=6) 7 jours après la lésion. Ces animaux réalisent aussi les tests de comportement à PRE, J1, J3 et J7.

4) SHAM (n=18) avec des animaux ayant subi la chirurgie sans l'ischémie cérébrale et dont les enregistrements électrophysiologiques sont réalisés soit au niveau de la moelle

épineière (n=10) soit au niveau du thalamus (n=8) 7 jours après l'opération. Les enregistrements électrophysiologiques des SHAM à J1 n'ont pas été réalisés car les SHAM-J1 de l'étude n°1 ne montrent pas de différence au niveau comportemental, histologique et électrophysiologique par rapport aux SHAM-J7 et aux témoins.

### ***Déroulement du protocole***

Sur des animaux éveillés, il est réalisé l'évaluation de la récupération fonctionnelle :

1) à partir de 2 tests comportementaux complémentaires évaluant plus particulièrement le versant sensitif (sensibilité mécanique à la pression ou tactile).

2) avant (PRE) et après l'ischémie cérébrale aux jours 1, 3 et 7 (J1, J3 et J7) seulement pour le groupe MCAO-J7 (en plus des SHAM et Témoins).

Sur des animaux anesthésiés, il est réalisé :

1) la chirurgie pour induire l'occlusion de l'ACM pour les groupes MCAO et cette même chirurgie mais sans occlusion pour les groupes SHAM.

2) les enregistrements électrophysiologiques soit à J1 pour le groupe MCAO-J1 soit à J7 pour les groupes MCAO-J7 et SHAM.

3) le prélèvement de l'encéphale à la fin de l'expérimentation afin d'effectuer l'analyse histologique. La coloration au crésyl violet est effectuée pour 1) s'assurer que les électrodes d'enregistrement sont bien placées au niveau du noyau VPL du thalamus et 2) mesurer la taille de la lésion cérébrale.

### **3.2.3 Induction d'une ischémie cérébrale par la MCAO-r**

La chirurgie pour induire l'ischémie cérébrale est similaire à celle du Chapitre I (*cf. p.57-58*).

### 3.2.4 Analyse comportementale : évaluation de la récupération fonctionnelle

Durant les 4 jours de la semaine précédant le début des mesures, les animaux sont familiarisés avec chaque test pour réduire le stress infligé par la manipulation des animaux.

#### *Test du Von Frey électronique*

Ce test évalue la sensibilité mécanique à la pression des pattes antérieures et postérieures des animaux à partir du Von Frey électronique (Von Frey électronique, *Bioseb apparatus*, Vitrolles, France) (Martinov *et al.*, 2013). Les rongeurs sont d'abord déposés sur une grille en fer. Une boîte en plastique transparente est ensuite placée par dessus les animaux, les empêchant de quitter la zone de la grille. Les mesures débutent une dizaine de minutes plus tard lorsque les animaux sont calmes et en position statique. Pour limiter les biais, les mesures sont toujours réalisées par le même expérimentateur et les essais sont effectués en aveugle<sup>1</sup>.

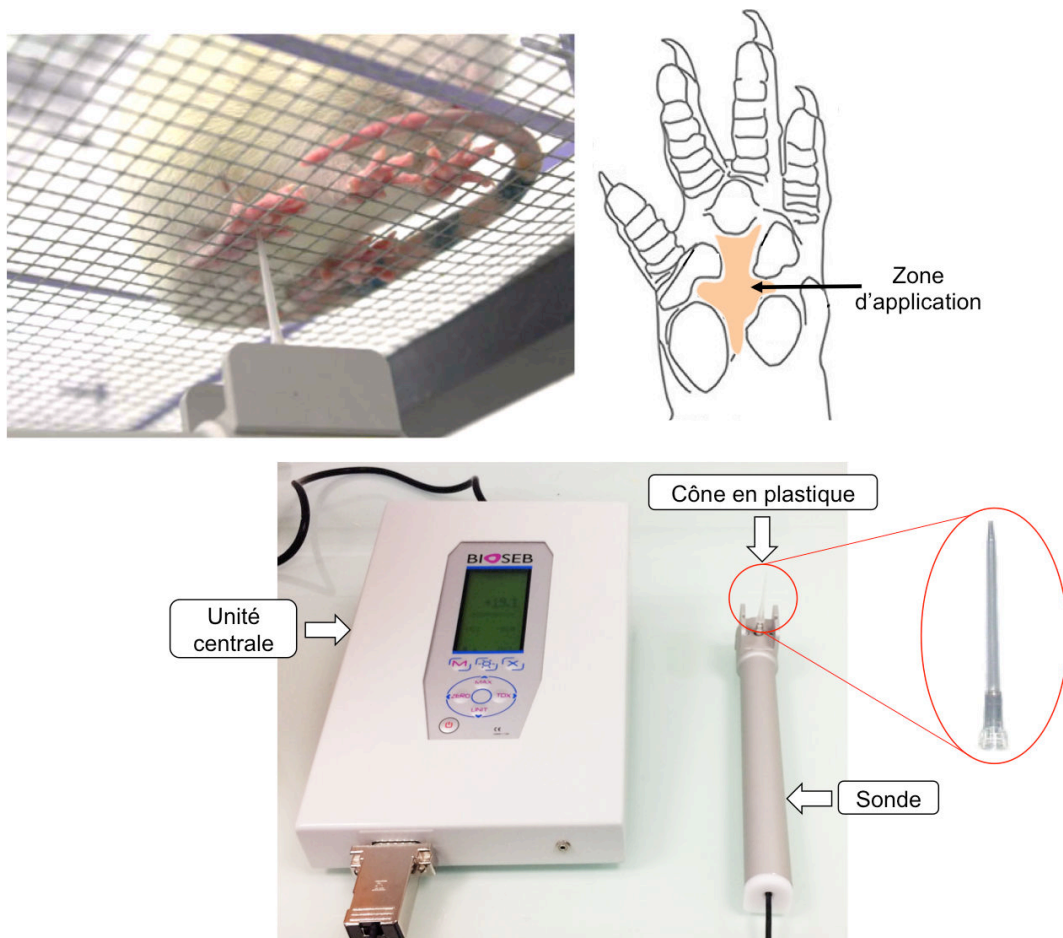
Un cône en plastique rigide, situé au bout d'une sonde reliée à une jauge de force d'une unité centrale, est appliqué sur la partie lisse de la surface plantaire des pattes à travers les trous de la grille (**Figure 2.7**). La pression mécanique appliquée augmente graduellement jusqu'à ce que l'animal retire sa patte. L'unité centrale enregistre alors la force maximale appliquée (en gramme) reflétant le seuil de sensibilité mécanique de la patte (seuil minimal ou l'animal ressent la pression mécanique). Chaque patte subit 6 essais espacés de 1 min pour éviter l'apparition d'une désensibilisation. Si l'animal ne retire toujours pas sa patte après 100 g, l'essai est terminé et la valeur 100 g est enregistrée. La valeur minimale et maximale est supprimée et les valeurs des 4 essais restant sont moyennées.

Les résultats pour chaque patte sont exprimés en valeurs brutes. De plus, les ratios du seuil de sensibilité mécanique à la pression de la patte antérieure gauche/patte antérieure

---

<sup>1</sup> Cela signifie que l'expérimentateur ne connaît pas à quel groupe appartiennent les animaux.

droite (PAG/PAD) et patte postérieure gauche/patte postérieure droite (PoG/PoD) sont également calculés à partir des valeurs brutes.

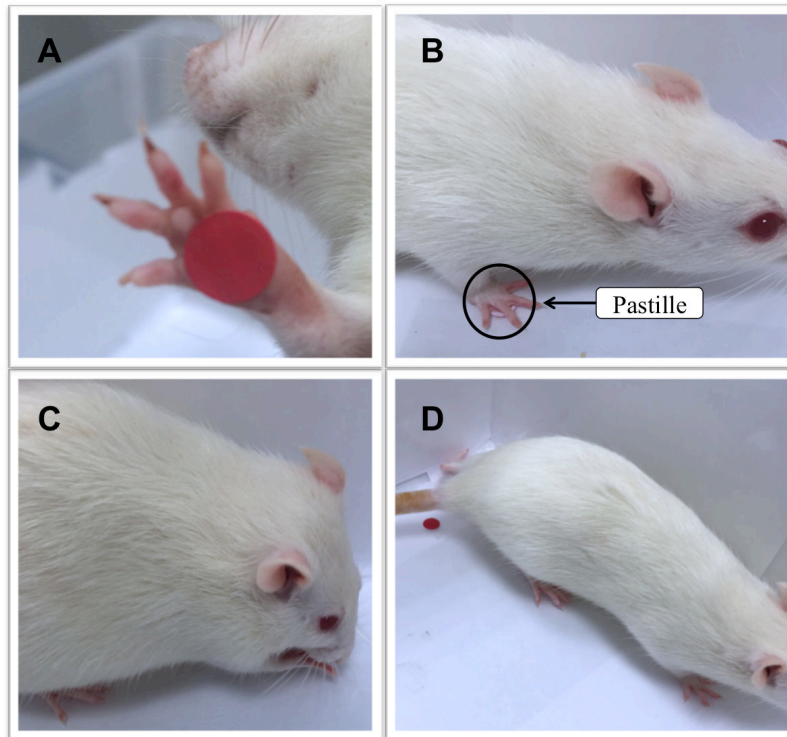


**Figure 2.7 :** Dispositif expérimental pour le test du Von Frey électronique.

### **Test du ruban adhésif (Adhesive removal test)**

Ce test évalue indépendamment la sensibilité tactile et la coordination motrice des pattes antérieures gauche (PAG) et droite (PAD) (Figure 2.8) (Schallert *et al.*, 1982; Schallert, 2006). Les animaux sont déposés dans une cage en plastique (dimensions : 45 cm x 60 cm) dans laquelle ils peuvent se mouvoir librement pendant 3 min (phase d'habituation à la cage avant chaque mesure). Ensuite, une pastille (8 mm de diamètre) est déposée sur la surface plantaire de la patte antérieure (Figure 2.8.A et B). Le temps de détection (TD) et de retrait (TR) de la pastille est mesuré (temps maximum fixé à 300 s). L'ordre de passage de chaque patte est alterné et randomisé. Deux essais par patte sont réalisés pour prévenir la

sensibilisation. Les résultats sont exprimés en valeurs brutes par rapport au PRE pour la patte antérieure gauche et pour la patte antérieure droite.



**Figure 2.8 :** Le test du ruban adhésif. La pastille est appliquée au niveau de la surface plantaire de la patte antérieure (A et B). Une fois la pastille détectée, l'animal tente de la retirer (C et D).

### 3.2.5 Mesures électrophysiologiques

#### *Préparation de l'animal*

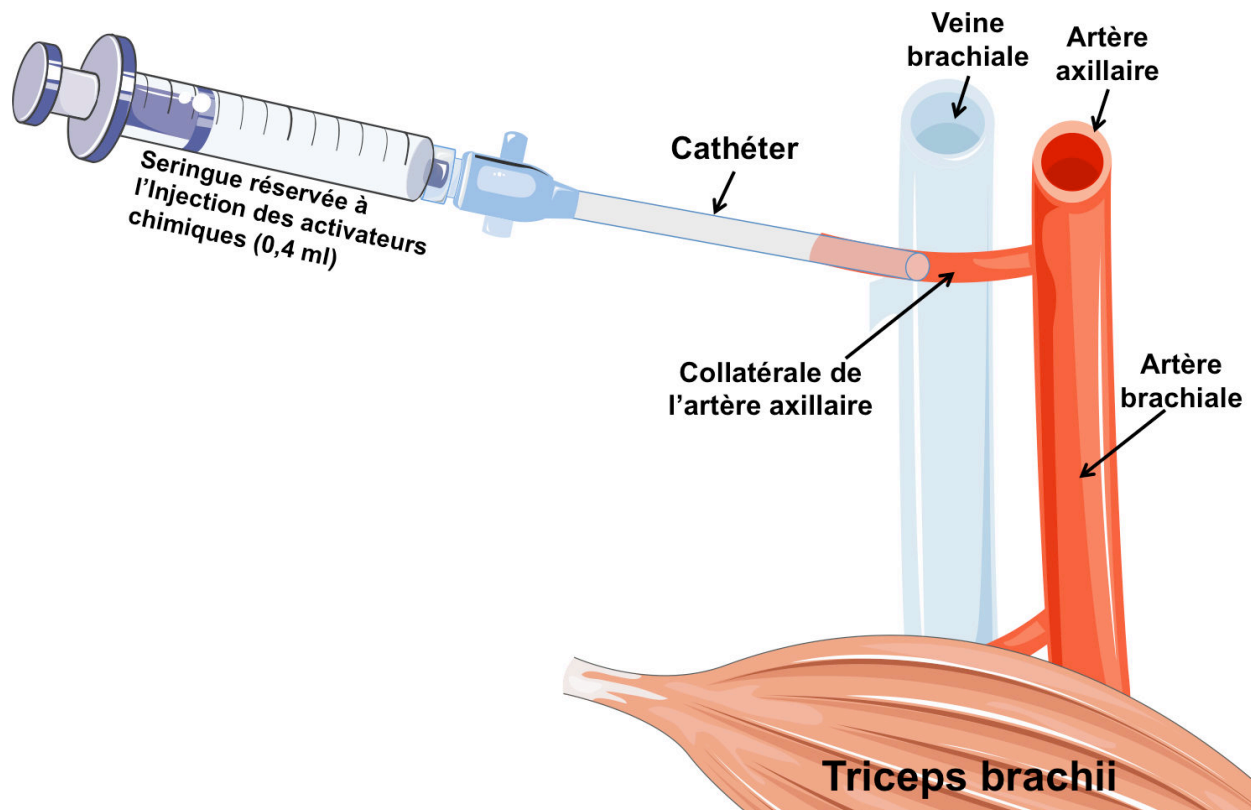
Les enregistrements électrophysiologiques sont effectués soit au niveau du ganglion de la racine dorsale de C7 (DRG, *dorsal root ganglion*) de la moelle épinière soit au niveau du noyau ventral postéro-latéral (VPL) du thalamus du côté ipsi- et controlésionnel. Les animaux sont anesthésiés avec une injection intra-péritonéale d'uréthane (100 mg/100 g) avant d'être rasés au niveau des zones opérées. La température interne des animaux est maintenue à 37°C grâce à un tapis chauffant (*Harvard Homeothermic Blanket Control Unit*, K01345CE).

### *Procédure chirurgicale pour la mise en place du cathéter artériel : phase commune aux 2 préparations*

Durant la première partie de la chirurgie, les animaux sont placés en décubitus dorsal. Cette phase chirurgicale consiste à délicatement dégager le nerf musculospiral innervant le *triceps brachii* de la patte antérieure gauche ainsi que les vaisseaux sanguins du plexus brachial. Les muscles *pectoralis major* et *minor* sont enlevés mettant en évidence 1) le nerf musculospiral, 2) l'artère axillaire – brachiale et ses collatérales et 3) la veine brachiale (Angélica-Almeida *et al.*, 2013). Tous les nerfs environnants le nerf musculospiral sont sectionnés pour éviter leur influence lors des enregistrements au niveau du DRG.

La seconde étape consiste à insérer un cathéter dans une des collatérales de l'artère axillaire afin de pouvoir diffuser des solutions au *triceps brachii* (Figure 2.9). Pour se faire, une hémisection à l'aide de micro-ciseaux est réalisée pour permettre l'introduction du cathéter qui sera fermement maintenu dans la collatérale de l'artère axillaire, sans entraver la circulation des produits injectés. Le débit sanguin est ainsi préservé dans l'artère brachiale puisque cette dernière est préservée de toute chirurgie. À partir de là, l'animal va subir soit la préparation pour les enregistrements effectués à la racine dorsale soit celle réservée aux enregistrements dans le thalamus.

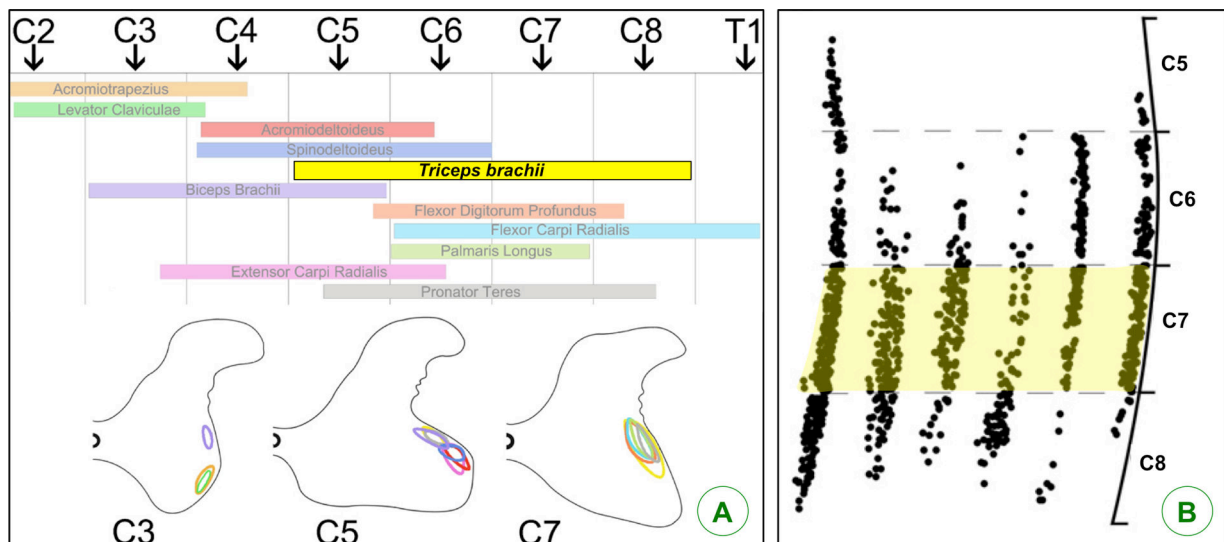




**Figure 2.9 :** Disposition du cathéter artériel pour l'injection de métabolites dans le triceps brachii. Le cathéter est inséré dans une collatérale de l'artère axillaire permettant de délivrer les activateurs chimiques des afférences métabosensibles jusqu'au triceps brachii. Lors des mesures dans le thalamus, la veine brachiale est clampée afin d'éviter tout effet humoral sur l'activité thalamique. L'effet éventuel doit être lié principalement à l'action des afférences métabosensibles.

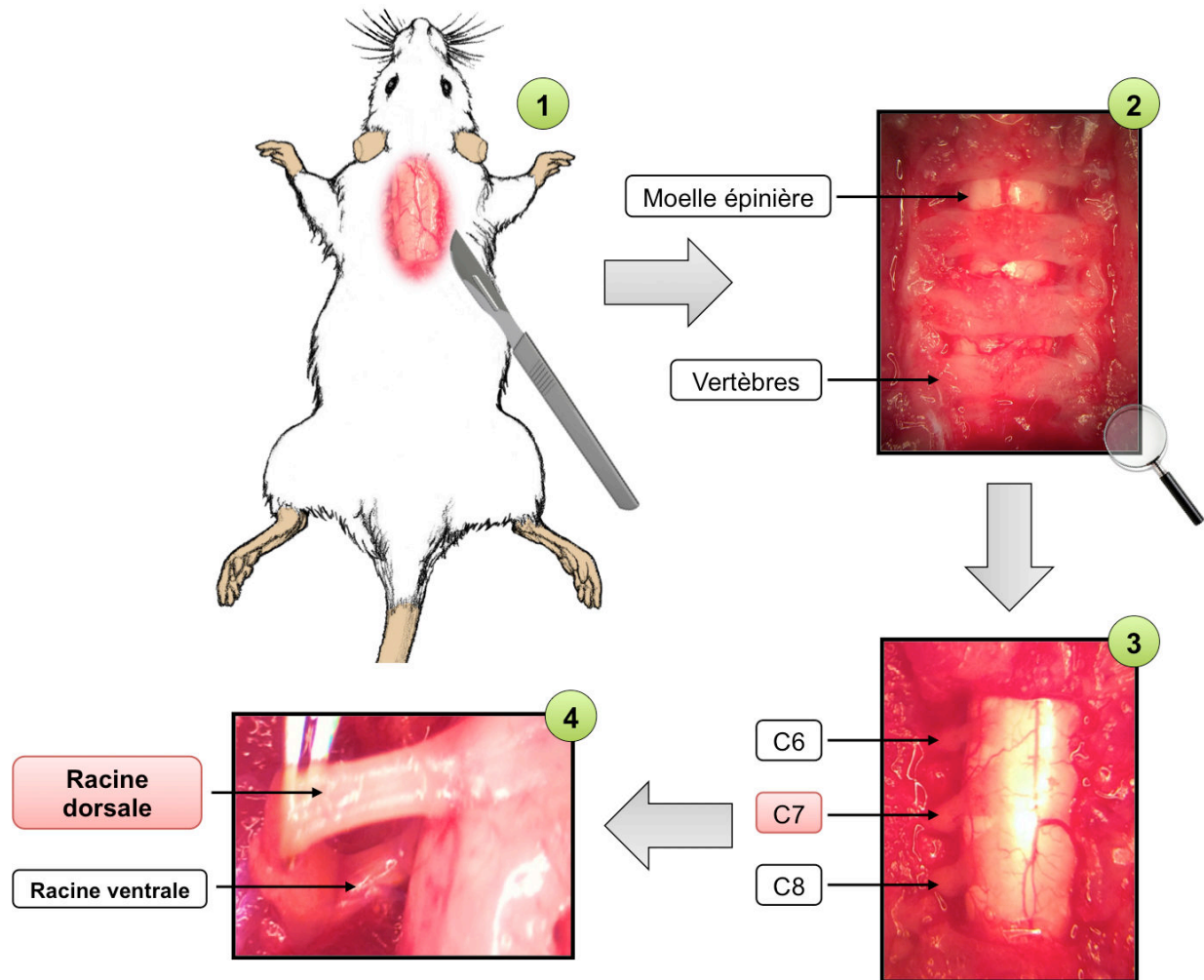
### *Procédure chirurgicale pour les enregistrements au niveau de la moelle épinière*

Cette procédure permet, pour un même animal, d'enregistrer la fréquence de décharge des afférences suite aux injections d'activateurs chimiques ainsi que la réponse du réflexe à ces mêmes injections. Les 2 types d'enregistrements sont séparés par 30 min. Cette étape consiste à exposer la racine dorsale et le DRG correspondant au niveau métamérique cervical 7-8 (C7-C8) où se trouvent les neurones des afférences en provenance du *triceps brachii* (Figure 2.10) (Tosolini & Morris, 2012).



**Figure 2.10 :** Distribution des motoneurones innervant le *triceps brachii* (en jaune) au niveau de la corne dorsale cervicale de la moelle épinière chez le rat. (A) Nous pouvons constater que les motoneurones innervant le *triceps brachii* sont localisés du segment C5 à C8. (B) Le segment C7 est celui qui regroupe la quantité la plus importante de motoneurones de ce muscle [adaptée de (Tosolini & Morris, 2012)]. C : cervical ; T : thoracique.

Pour cela, l'animal est placé en décubitus ventral et la patte antérieure gauche est solidement fixée à un angle de 130°. Une laminectomie est alors pratiquée pour les vertèbres allant de C5 à T1 mettant en évidence les racines dorsales et ventrales (**Figure 2.11**). La dure-mère est ensuite enlevée pour séparer ces deux racines.



**Figure 2.11 :** Illustration de la première étape de la chirurgie où les ganglions dorsaux et la racine dorsale sont exposés. (1) L'animal est placé en position ventrale avant que (2) la colonne vertébrale ne soit exposée. (3) Une laminectomie est pratiquée de C6 à C8 afin (4) d'exposer la racine ventrale et la racine dorsale C7 sur laquelle les électrodes d'enregistrement sont disposées.

### *Mesure du réflexe somatique évoqué électriquement au niveau de la racine dorsale*

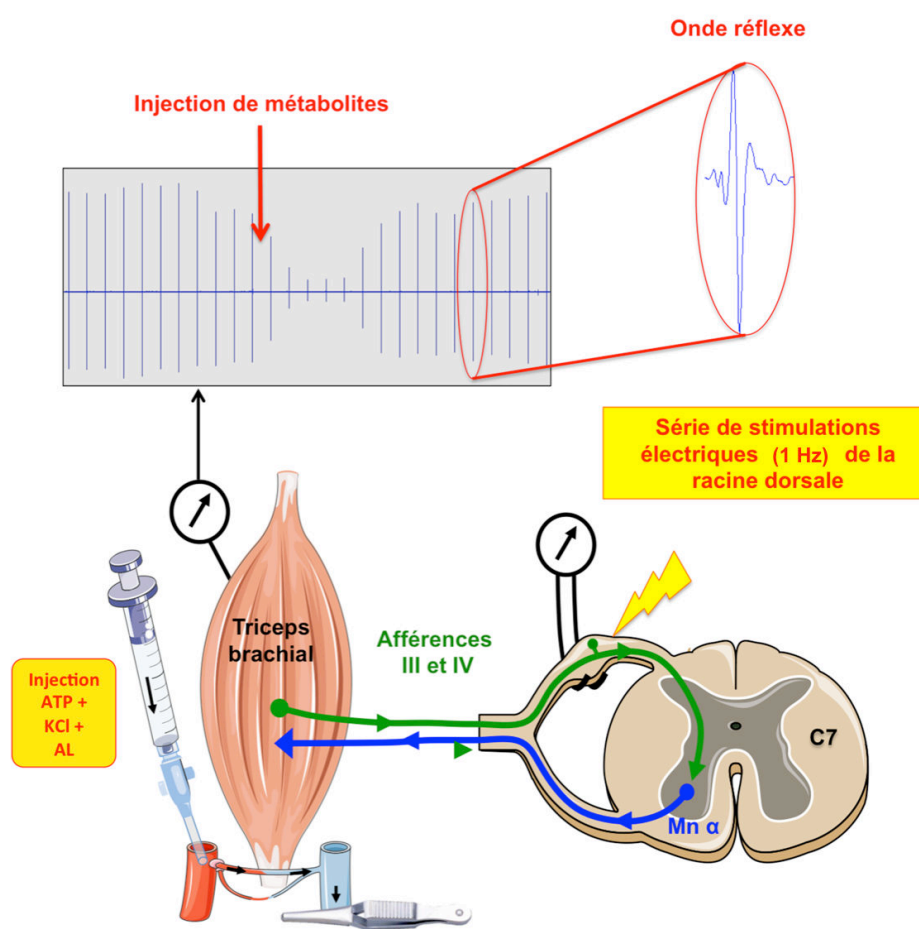
Une stimulation électrique de forme rectangulaire (durée de 1 ms) est directement appliquée à l'aide d'un neurostimulateur à courant constant (Digitimer DS7 A<sup>®</sup>, Welwin, Garden City, Hertfordshire, Angleterre), au niveau de la racine dorsale C7 en utilisant une paire d'électrode en tungstène (**Figure 2.12**). L'amplitude du réflexe (en mV) est enregistrée par une paire d'électrodes bipolaires intramusculaires (MLA 1204 *needle electrodes*, 29-gauge, 2-mm pin, AD Instruments, Paris, France) insérée dans la partie latérale du *triceps brachii*. Une électrode de référence est implantée dans un tissu neutre environnant. Le signal nerveux est amplifié (2 kHz) puis filtré (30 Hz to 10 kHz) grâce à un amplificateur différentiel (P2MP; SARL, Marseille, France) (Laurin *et al.*, 2016).

L'intensité de la stimulation électrique est progressivement augmentée jusqu'à ce que l'amplitude du réflexe cesse d'augmenter (début à 0,05 mA; incrément de 0,01 mA). Vingt réflexes somatiques sont ensuite évoqués toutes les secondes durant 20 secondes (1 Hz) pour contrôler la stabilité de l'amplitude du réflexe. Après 10-15 min de repos pour limiter l'accumulation de la fatigue, 6 réflexes somatiques sont évoqués à 1 Hz avant (PRE) l'injection de trois combinaisons de deux activateurs chimiques spécifiques des afférences métabosensibles (0,4 ml) et 20 réflexes sont évoqués après (Laurin *et al.*, 2010, 2016). En accord avec des travaux précédents, les combinaisons d'activateurs suivantes sont injectées toutes les 12 min pour s'assurer que les concentrations musculaires de produits injectés reviennent à leurs concentrations de base (Rybicki *et al.*, 1985). Les doses sont déterminés en accord avec plusieurs travaux antérieurs (Hanna & Kaufman, 2003; Light *et al.*, 2008) :

- 10 mM de chlorure de potassium (KCl) et 25 mM d'acide lactique (AL) : **KCl 10-AL 25**,
- 25 mM d'AL et 50 µg/kg d'adénosine triphosphate (ATP) : **AL 25 -ATP**,
- 50 mM de KCl et 50 mM d'AL : **KCl 50-AL 50**.

Cette procédure permet de mesurer l'influence des afférences métabosensibles sur la réponse du réflexe somatique. L'amplitude des 6 réflexes de référence est moyennée. Pour les 20 réflexes POST-injection, les amplitudes de deux réflexes successifs sont à chaque fois moyennées et ce jusqu'à la fin de l'enregistrement avant d'être comparés aux valeurs PRE. Le ratio POST/PRE injection est ensuite calculé ainsi que le pourcentage de variation entre l'amplitude maximale POST-injection et l'amplitude PRE (% du PRE) (Laurin *et al.*, 2016).

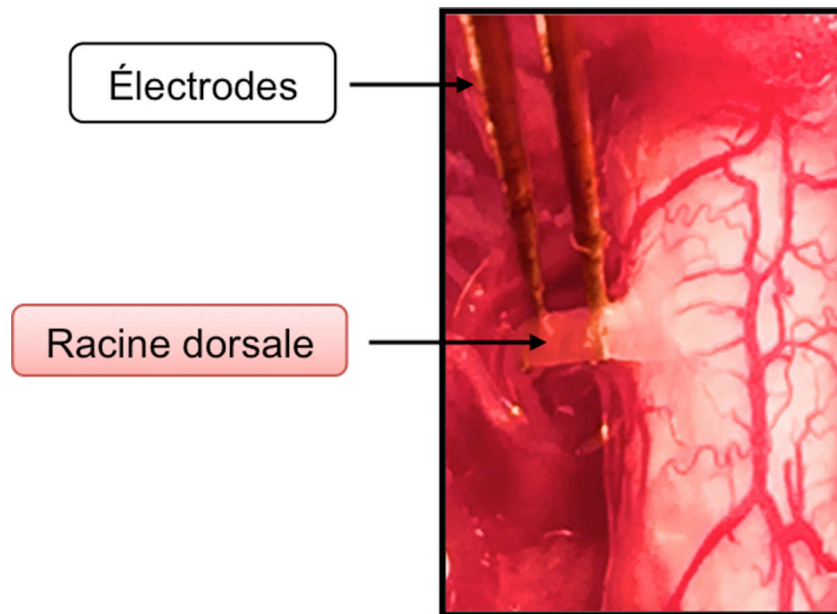
Il est important de préciser que l'emplacement des électrodes dans le *triceps brachii* reste inchangé durant la totalité des enregistrements assurant une comparaison fiable entre les mesures PRE- et POST-injection. De plus, une série de réflexes est à nouveau évoquée en injectant du sérum physiologique afin de confirmer que seul les activateurs chimiques spécifiques influencent la réponse du réflexe.



**Figure 2.12 :** Procédure expérimentale en électrophysiologie pour la mesure du réflexe somatique suite à l'activation des afférences musculaires des groupes III et IV via l'injection de métabolites. ATP : adénosine triphosphate ; KCl : chlorure de potassium ; AL : acide lactique ; Mn- $\alpha$ .

### *Enregistrement de la réponse des afférences musculaires métabosensibles*

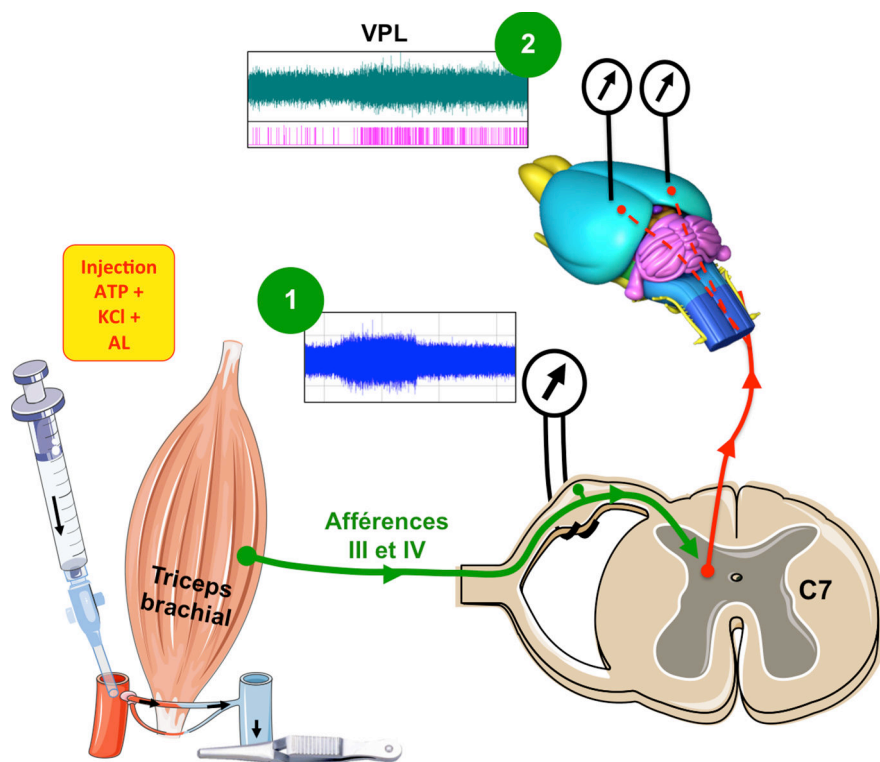
La racine dorsale correspondant au métamère C7 ou C8 est positionnée sur une paire d'électrode bipolaire en tungstène avant d'être immergée dans de l'huile de paraffine (isolant électrique). La position des électrodes sur la racine dorsale n'est jamais modifiée au cours de l'enregistrement (**Figure 2.13**).



**Figure 2.13:** Positionnement des électrodes de stimulation ou d'enregistrement sur la racine dorsale C7 controlatérale à l'ischémie cérébrale. Cette racine contient, entre autres, les afférences originaires du triceps brachii. Étant donné que les autres nerfs sont coupés, seules l'activité des fibres afférentes du triceps brachii est enregistrée.

Le signal nerveux est amplifié (10-100 K) et filtré (30-10 kHz) avec un amplificateur différentiel (P2MP<sup>®</sup> SARL, Marseille, France). Ce signal est également référé au signal électrique enregistré par une électrode de référence implantée dans les tissus neutres environnants. Le signal électrique émis par les afférences est discriminé (P2MP<sup>®</sup> SARL, Marseille, France), à partir duquel la fréquence de décharge de ces afférences est extraite, puis enregistrée avec le système Biopac (Biopac MP150<sup>®</sup>, Biopac System, Paris, France). Le signal est ensuite analysé avec un logiciel d'acquisition et de traitement du signal (*AcqKnowledge software, Biopac System, Paris, France*).

Avant l'injection des stimuli chimiques (les 3 doses), un enregistrement de l'activité basale des afférences est effectué afin de s'assurer que la fréquence de décharge est stable. Pour cela, le signal nerveux est enregistré durant 200 s sans injection chimique. L'enregistrement est considéré acceptable si la fluctuation du signal de base n'excède pas  $\pm 10\%$  tout au long de l'enregistrement. En conséquence, les variations de la fréquence de décharge enregistrées après les injections sont liées aux stimuli appliqués et non aux conditions environnementales. Une fois la fréquence de base établie, les différentes combinaisons d'activateurs chimiques sont injectées (0,4 mL) directement dans une collatérale de l'artère axillaire 60 s après le début de l'enregistrement de la fréquence de décharge (PRE), continuant ensuite sur 150 s (POST-injection). Les différentes injections sont séparées par 12 minutes pour limiter l'influence des injections les unes sur les autres. L'enregistrement des fréquences de décharge de base est répété entre les injections chimiques (Figure 2.14).



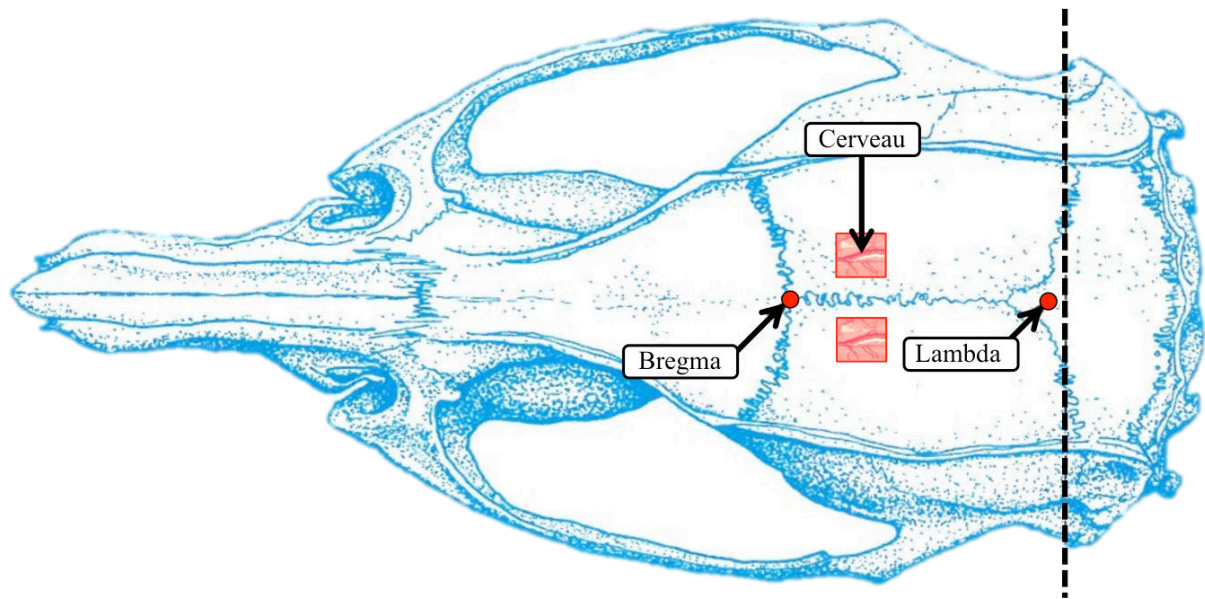
**Figure 2.14 :** Procédure expérimentale en électrophysiologie pour l'enregistrement de la fréquence de décharges des afférences musculaires des groupes III et IV (1) et de l'activité des VPL ipsi- et contralatéral du thalamus (2) en réponse à l'injection de métabolites. ATP : adénosine triphosphate ; KCl : chlorure de potassium ; AL : acide lactique ; VPL : noyau ventro-postéro-latéral.

La fréquence de décharge POST-injection est comparée à la fréquence de décharge de base (PRE) et la variation est exprimée en pourcentage de la fréquence de décharge basale correspondante (*i.e.* fréquence de décharge de base correspondant à 0 %). Le profil temporel de la variation de la fréquence de décharge et l'extraction de la fréquence de décharge maximale après chaque injection est réalisé par un programme Matlab spécifique (The MatWorks, version 8.0.0.783 R2012b). Brièvement, la fréquence de décharge est mesurée sur une période de 10 secondes tout au long de la période d'enregistrement, durant laquelle la fréquence de décharge est calculée sur différents intervalles de temps durant de 1 à 10 s et moyennée entre elles. La période de 10 s POST-injection est comparée avec la fréquence de décharge basale. De plus, le ratio POST/PRE injection est calculé pour chaque groupe.

### *Procédure chirurgicale et enregistrement de la fréquence de décharge au niveau des noyaux VPL*

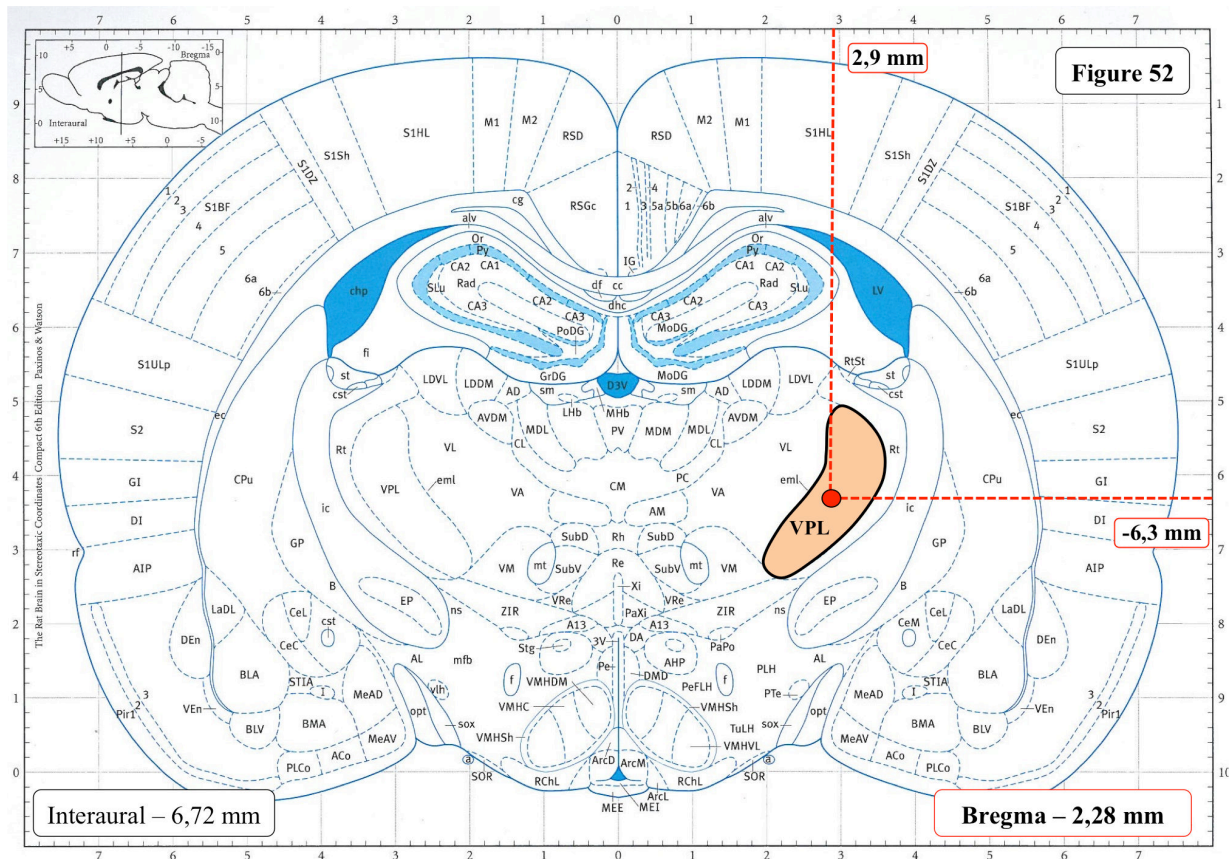
Une fois que le cathéter est inséré dans la collatérale de l'artère axillaire comme décrit plus haut, l'animal est placé en décubitus ventral. La tête de l'animal est placée dans un cadre stéréotaxique afin de déterminer les coordonnées dans les 3 axes de référence (*i.e.* axe rostro-caudal, axe dorso-ventral et axe medio-latéral) du noyau VPL de chaque hémisphère. Une fois la peau incisée, les os du crâne sont exposés laissant apparaître le *bregma* et le *lambda* (Figure 2.15).





**Figure 2.15 :** Les os du crâne chez le rat servant de repère pour la stéréotaxie (vue dorsale). Le bregma est le point anatomique reliant la suture coronale (séparant l'os pariétal et l'os frontal) à la suture sagittale (séparant les deux os pariétaux) permettant de déterminer les coordonnées des structures cérébrales. Une fois la craniotomie effectuée, le cerveau est exposé laissant le passage pour les électrodes.

Le *bregma* est un référentiel à partir duquel les coordonnées de la structure d'intérêt sont déterminées relativement à chaque animal. Les coordonnées du noyau VPL sont : 2,9 mm pour l'axe dorso-ventral , -6,3 mm pour l'axe medio-latéral et -2,28 pour l'axe rostro-caudal [figure 52 de l'Atlas de (Paxinos & Watson, 2006)] (Figure 2.15). Une fois les coordonnées du noyau VPL définies, une craniotomie de 4 mm<sup>2</sup> environ est réalisée à l'aide d'une perceuse électrique (WPI<sup>®</sup>, World Precision Instruments, Hertfordshire, United Kingdom) sur la zone d'intérêt. Enfin, la dure-mère est enlevée et une paire d'électrodes bipolaires en platine est délicatement insérée jusqu'au noyau VPL. L'opération est répétée pour les deux hémisphères.



**Figure 2.15 :** Coupe coronale de cerveau selon la figure 52 de l'Atlas de Paxinos & Watson (2006). Les pointillés représentent les coordonnées pour les axes dorso-ventral (2,9 mm) et medio-latéral (-6,3 mm) du VPL. La coordonnée de l'axe rostro-caudal est définie à -2,28 mm du bregma (Paxinos & Watson, 2006).

Une injection de sérum physiologique est effectuée pour s'assurer que l'administration d'une substance liquide (et donc la pression intramusculaire légère) n'a pas d'influence sur la réponse des noyaux thalamiques. Avant chaque injection, la veine brachiale, sortant du *triceps brachii*, est clampée afin de bloquer le retour veineux et donc d'éviter l'activation du neurones thalamiques suite à la diffusion humorale des substances chimiques. Ainsi, la fréquence de décharge enregistrée dans le VPL est la conséquence d'une activation nerveuse des afférences musculaires. Là encore, les 3 injections différentes d'activateurs spécifiques des afférences III et IV sont réalisées avec 12 min de récupération entre chacune d'elles (Figure 2.14).

Le protocole d'enregistrement de la fréquence de décharge et du traitement de l'activité des noyaux thalamiques avec le logiciel Matlab est similaire à celui utilisé pour les afférences métabosensibles (voir section « *Enregistrement de la réponse des afférences musculaires métabosensibles* »).

Pour le VPL ipsi- et controlatéral, la variation de fréquence de décharge suite à chaque injection (IP, pour le côté ipsilatéral et CT, pour le côté controlatéral) est calculée en pourcentage de la fréquence de décharge basale correspondante (*i.e.* fréquence de décharge de base correspondant à 0 %). De plus, nous avons tenu compte de la variation de fréquence de décharge suite à l'injection de sérum physiologique (PHY). Ainsi, la variation de réponse aux injections d'activateurs est exprimée en pourcentage de la variation PHY. De plus, les ratios ipsilatéral (IP/IP-PHY) pour le VPL ipsilatéral et controlatéral (CT/CT-PHY) pour le VPL controlatéral sont aussi calculés.

### *Influence du PPADS sur la réponse des afférences métabosensibles et la réponse des réflexes*

Afin de s'assurer que les afférences des groupes III et IV répondent bien aux produits injectés, la réponse des afférences et les variations de l'amplitude des réflexes somatiques sont enregistrés avant et après l'administration de PPADS, un antagoniste des récepteurs P2X.

Le PPADS est dissous dans du sérum physiologique (10 mg/kg, 0,2 ml) comme précédemment réalisé (Hanna & Kaufman, 2003; Kindig *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012a). Avant d'injecter le PPADS dans la collatérale de l'artère axillaire, cette dernière et le retour veineux sont bloqués par des clamps afin de piéger le PPADS dans la circulation du *triceps brachii* pendant 15 min. Le PPADS a une couleur orange et peut être donc observé à l'œil nu entrant dans les vaisseaux du *triceps brachii*. Si cela n'est pas le cas, les données ne sont pas prises en compte. Les clamps sont retirés permettant une reperfusion du muscle. Les

enregistrements sont répétés 30 min plus tard (Hanna & Kaufman, 2003; Kindig *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012a). Seules les injections de KCl 10-AL 25 et AL 25 –ATP sont réalisées afin de ne pas multiplier les injections pour le même animal.

### 3.2.6 Analyses histologiques : évaluation de la taille de la lésion cérébrale et vérification de l'emplacement des électrodes dans le thalamus

#### *Perfusion intracardiaque, fixation des tissus et coloration au crésyl violet*

Le protocole pour réaliser l'ensemble de ces étapes est rigoureusement identique à celle du Chapitre I (*cf. p.69-70*). Le crésyl violet est utilisé dans cette étude pour vérifier l'emplacement des électrodes dans les deux noyaux VPL du thalamus ipsi- et controlatéral.

#### *Coloration au TTC*

Une fois les enregistrements électrophysiologiques terminés, quelques animaux, toujours sous anesthésie, sont sacrifiés par décapitation. L'encéphale est rapidement retiré puis placé à -80° durant 4 min. Le cerveau est ensuite placé dans un *brain slicer*, à partir duquel il est possible d'effectuer des sections coronales de 2 mm d'épaisseur. Les coupes de cerveau (6 ou 7) sont ensuite immergées dans 5 ml d'une solution d'1 % de TTC (Sigma-Aldrich®) durant 30 min à une température de 37° C. Les coupes sont ensuite rincées 3 fois (1 min) avec du PBS-1X puis fixées avec de l'antigenfix durant 24 h. Une fois l'acquisition des images effectuée, l'aire de la zone infarctée ainsi que l'aire totale de chaque hémisphère est délimitée et calculée à partir du logiciel ImageJ. La taille de la lésion est exprimée en pourcentage de l'hémisphère lésé et du cerveau total.

### 3.2.7 Analyses Statistiques

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. L'analyse statistique est effectuée à partir du logiciel SigmaStat (SigmaStat<sup>®</sup> 2.03, *Statistical software*, San Jose, CA, États Unis). Les valeurs des tests comportementaux de J1 à J7 par rapport au PRE sont moyennées et comparées entre les groupes à partir d'une ANOVA à 2 facteurs (temps x groupes). La réponse des afférences métabosensibles, du VPL ipsi- et controlatéral et du réflexe somatique est moyennée et comparée entre les groupes à partir d'une ANOVA à 1 facteur. L'analyse post-hoc est réalisée à partir de la méthode *Student-Newman-Keuls* pour mettre en évidence les différences significatives. De plus, les modifications PRE/POST-injections et PRE-PPADS/POST-PPADS de la réponse des afférences métabosensibles et du réflexe somatique dans chaque groupe sont comparées à partir d'un test de *Student*. Un résultat est considéré significatif lorsque  $p < 0,05$ .

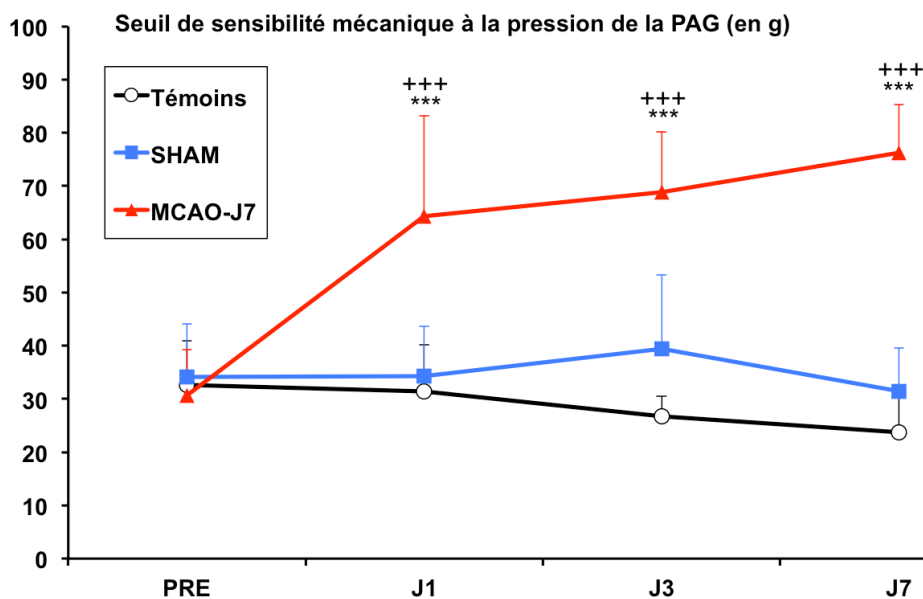
### 3.3 Résultats de l'étude n°2

#### 3.3.1 Analyse comportementale : évaluation de la récupération fonctionnelle

Que ce soit pour le test du Von Frey ou pour le test du ruban adhésif, aucune différence n'est observée dans les groupes Témoins et SHAM de J1 à J7 par rapport à PRE. De même, il n'y a pas de différence entre ces groupes de J1 à J7. Par ailleurs, les valeurs PRE ne diffèrent pas entre les groupes Témoins, SHAM et MCAO-J7.

#### Test du Von Frey électronique

**Sensibilité mécanique de la patte antérieure gauche.** Pour le groupe MCAO-J7, le seuil de sensibilité mécanique à la pression de la patte antérieure gauche (côté parétique) augmente significativement à J1 (64,3 g±18,8 g), J3 (68,8 g±11,3 g) et J7 (76,2 g±9,2 g) par rapport à PRE (30,6 g±8,6 g) ( $p<0,001$ ). Ce seuil est également supérieur à celui des groupes Témoins (PRE= 32,6 g±8,4 g ; J1= 31,4 g±8,8 g ; J3= 26,7 g±3,8 g ; J7= 23,7 g±6,7 g) et SHAM (PRE= 34,2 g±10,0 g ; J1= 34,2 g±9,4 g ; J3= 39,4 g±13,9 g ; J7= 31,5 g±8,1 g) de J1 à J7 ( $p<0,001$ ) (**Figure 2.17**).



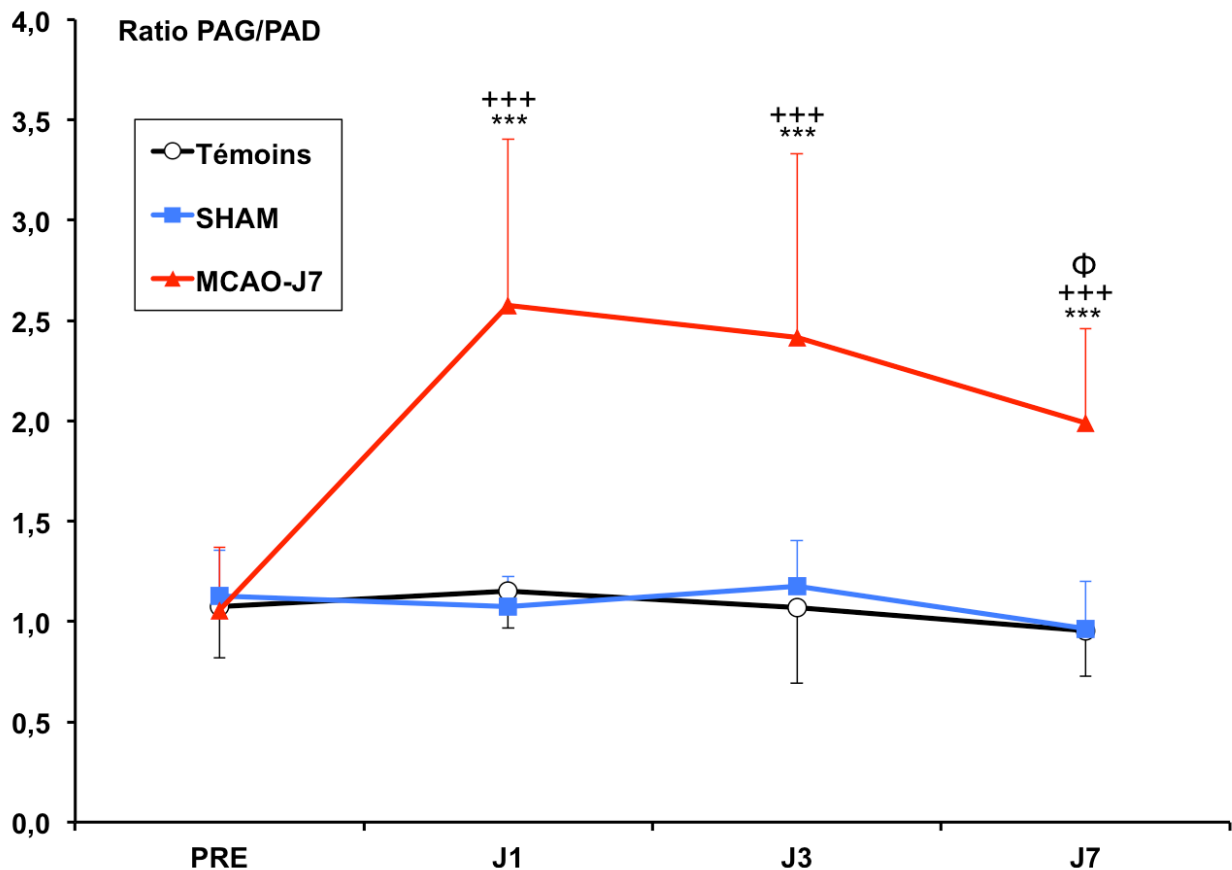
**Figure 2.17 :** Seuil de sensibilité mécanique à la pression mesuré à partir du Von Frey électronique de la patte antérieure gauche. \* indique une augmentation significative du seuil de sensibilité mécanique à la pression à J1, J3 et J7 par rapport à PRE pour le groupe MCAO-J7. + indique un seuil de sensibilité mécanique à la pression supérieur pour le groupe MCAO-J7 par rapport aux groupes Témoins et SHAM de J1 à J7.

**Sensibilité mécanique de la patte antérieure droite.** Le seuil de sensibilité mécanique à la pression de la patte antérieure droite n'est pas modifié de J1 à J7 par rapport à PRE dans les groupes Témoins (PRE : 30,5 g±4,6 g ; J1 : 31,4 g±6,0 g ; J3 : 26,9 g±10,7 g et J7 : 25 g±8,8 g), SHAM (PRE : 30,7 g±7,8 g ; J1 : 33,3 g±10,1 g ; J3 : 33,3 g±9,1 g et J7 : 33,4 g±8,3 g) et MCAO-J7 (PRE : 30,8 g±12,6 g ; J1 : 26,4 g±8,5 g ; J3 : 30,9 g±8,5 g et J7 : 39,7 g±7,4 g). De même, le seuil de sensibilité mécanique à la pression de la patte antérieure droite ne diffère pas entre les groupes de J1 à J7 (*données non-présentées*).

**Sensibilité mécanique de la patte postérieure gauche et droite.** Il n'y a pas de différence significative de J1 à J7 concernant le seuil de sensibilité mécanique à la pression des pattes postérieures gauche et droite (*données non-présentées*).

**Ratio PAG/PAD du seuil de sensibilité mécanique.** Le ratio PAG/PAD augmente significativement à J1 ( $2,6 \pm 0,8$ ), J3 ( $2,4 \pm 0,9$ ) et J7 ( $2,0 \pm 0,5$ ) par rapport à PRE ( $1,1 \pm 0,3$ ) dans le groupe MCAO-J7 ( $p < 0,001$ ). Cependant, ce ratio diminue significativement à J7 par rapport à J1 ( $p < 0,01$ ) et J3 ( $p < 0,05$ ). Le ratio PAG/PAD n'est pas modifié dans les groupes Témoins (PRE=  $1,1 \pm 0,3$  ; J1=  $1,1 \pm 0,2$  ; J3=  $1,1 \pm 0,4$  et J7=  $1,0 \pm 0,2$ ) et SHAM (PRE=  $1,1 \pm 0,2$  ; J1=  $1,1 \pm 0,1$  ; J3=  $1,2 \pm 0,2$  et J7=  $1,0 \pm 0,2$ ) par rapport à PRE (Figure 2.18).

Par ailleurs, le ratio PAG/PAD est significativement supérieur de J1 à J7 pour le groupe MCAO-J7 par rapport aux groupes Témoins et SHAM ( $p < 0,001$ ).



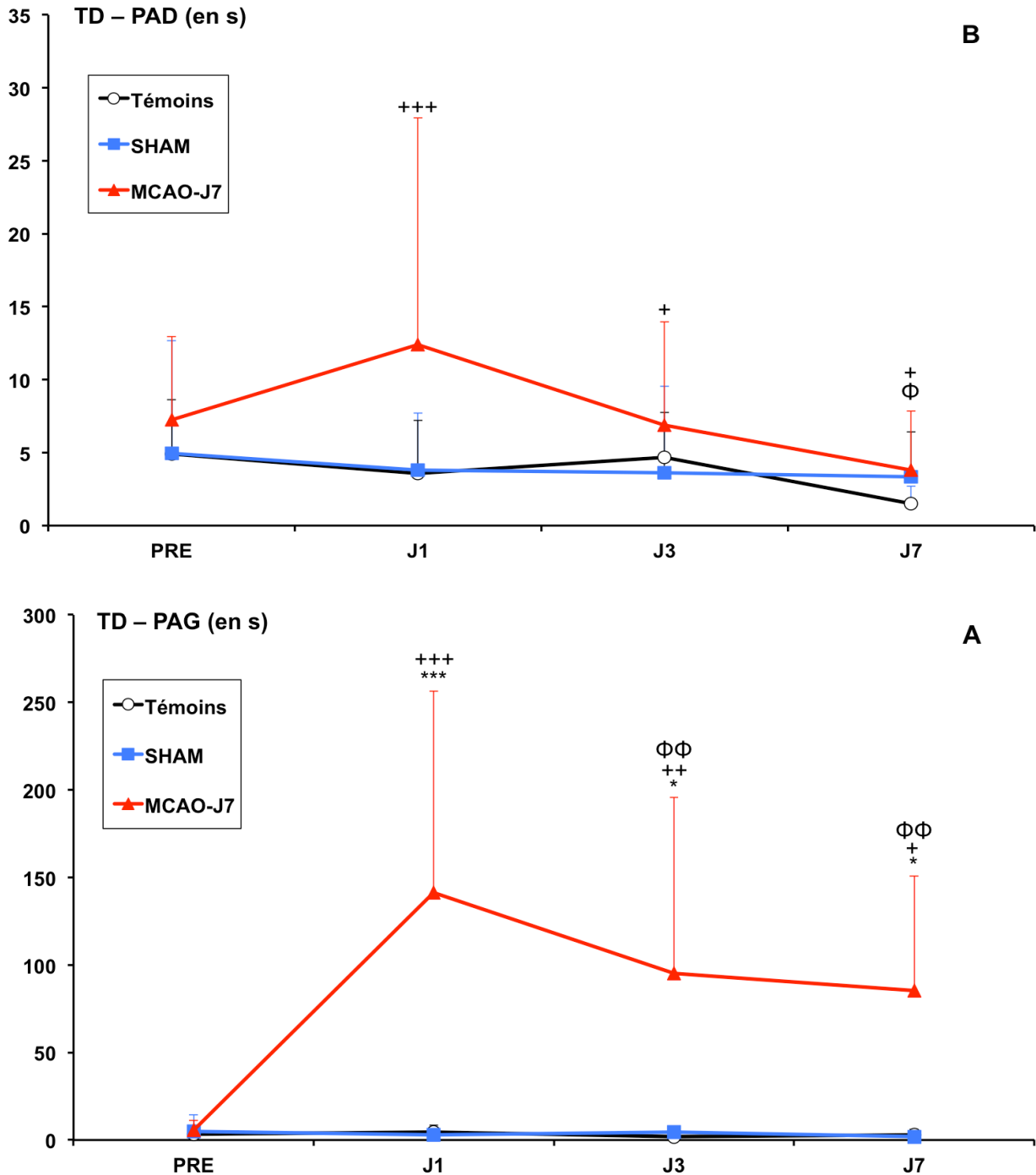
**Figure 2.18 :** Ratio PAG/PAD du seuil de sensibilité mécanique à la pression. \* indique une augmentation significative du ratio PAG/PAD pour le groupe MCAO à J1, J3 et J7 par rapport à PRE. Φ indiquent une diminution significative du ratio PAG/PAD pour le groupe MCAO à J7 par rapport à J1 et à J3. + indique un ratio PAG/PAD supérieur pour le groupe MCAO par rapport aux groupes Témoins et SHAM de J1 à J7.



### *Test du ruban adhésif*

**Temps de détection par la patte antérieure gauche (TD-PAG).** Le TD-PAG augmente significativement à J1 ( $141,4 \pm 115,1$  s ;  $p < 0,001$ ), J3 ( $95,1 \pm 100,7$  s ;  $p < 0,05$ ) et J7 ( $85,4 \pm 65,4$  s ;  $p < 0,05$ ) par rapport à PRE ( $5,6 \pm 5,4$  s) dans le groupe MCAO-J7. Cependant, une diminution significative du TD-PAG est observée dans le groupe MCAO-J7 à J3 et J7 par rapport à J1 ( $p < 0,01$ ) (**Figure 2.19.A**). Par ailleurs, le TD-PAG est significativement supérieur dans le groupe MCAO-J7 par rapport aux groupes Témoins (PRE :  $3,2 \pm 2,6$  s ; J1 :  $4,5 \pm 4,0$  s ; J3 :  $1,9 \pm 1,4$  s et J7 :  $3,1 \pm 3,0$  s) et SHAM (PRE :  $5,1 \pm 9,2$  s ; J1 :  $2,8 \pm 2,9$  s ; J3 :  $4,4 \pm 3,0$  s et J7 :  $2,0 \pm 1,4$  s) à J1 ( $p < 0,001$ ), J3 ( $p < 0,05$  et  $p < 0,01$  respectivement) et à J7 ( $p < 0,05$ ).

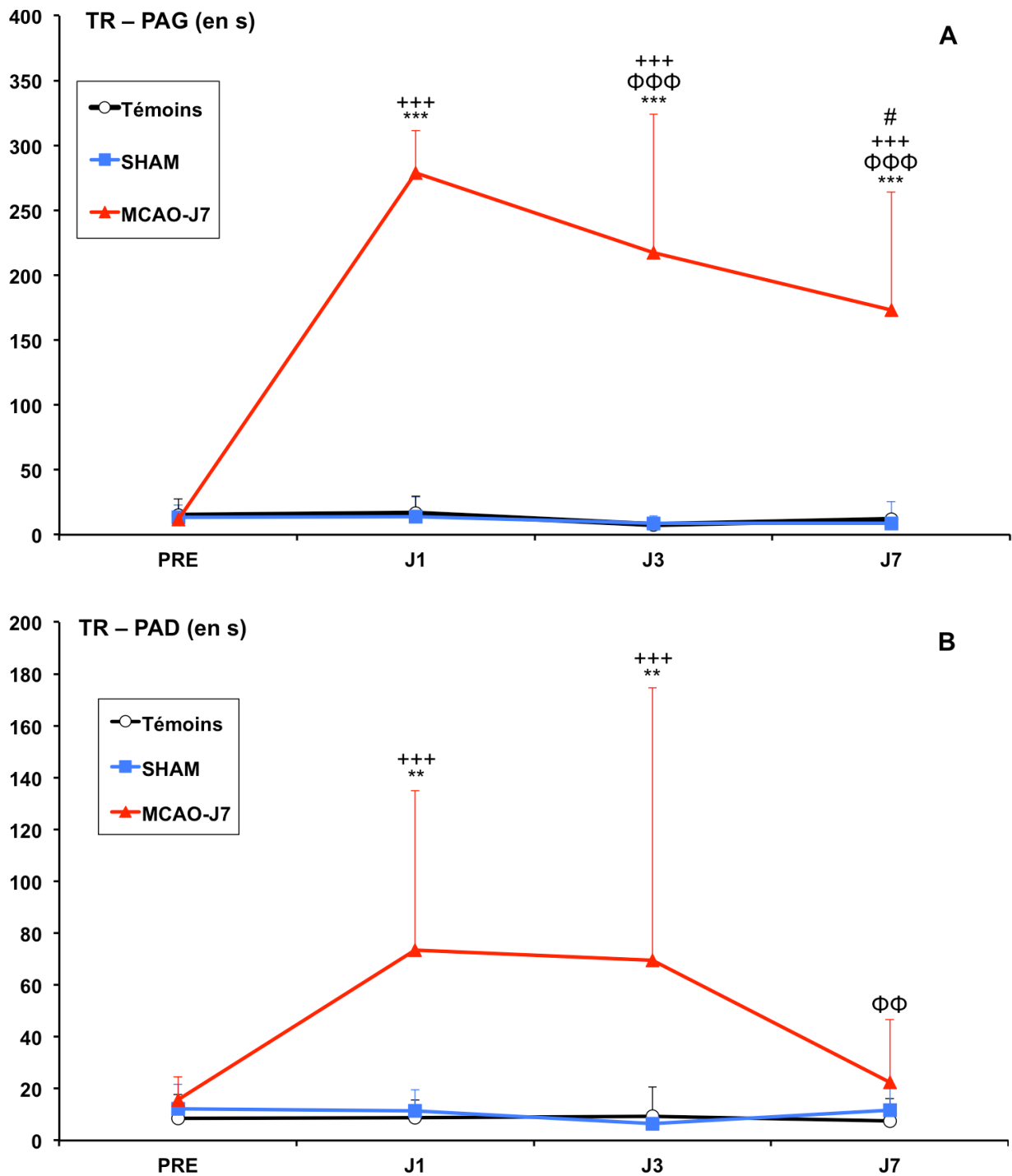
**Temps de détection par la patte antérieure droite (TD-PAD).** Le TD-PAD diminue significativement à J7 ( $3,8 \pm 4,1$  s ;  $p < 0,05$ ) par rapport à J1 ( $12,4 \pm 15,5$  s) dans le groupe MCAO-J7 (**Figure 2.19.B**). Le TD-PAD est significativement supérieur pour le groupe MCAO-J7 par rapport aux groupes Témoins (PRE :  $4,9 \pm 7,8$  s ; J1 =  $3,6 \pm 4,1$  s ; J3 :  $4,7 \pm 4,9$  s et J7 :  $1,5 \pm 1,2$  s) et SHAM (PRE :  $5,0 \pm 3,7$  s ; J1 :  $3,8 \pm 3,4$  s ; J3 :  $3,6 \pm 4,1$  s et J7 :  $3,3 \pm 3,1$  s) à J1 ( $p < 0,001$ ), J3 ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$  respectivement) et à J7 ( $p < 0,05$ ).



**Figure 2.19 :** Temps de détection de la pastille par la patte antérieure gauche (A) et par la patte antérieure droite (B). \* indique une augmentation significative du TD dans le groupe MCAO de J1 à J7 par rapport à PRE. ΦΦ indique une diminution significative du TD dans le groupe MCAO à J3 et J7 par rapport à J1. + indique un TD supérieur pour le groupe MCAO par rapport aux groupes Témoins et SHAM à J1, J3 et à J7. TD : temps de détection.

**Temps de retrait pour la patte antérieure gauche (TR-PAG).** Le TR-PAG augmente significativement dans le groupe MCAO-J7 à J1 ( $279,0 \pm 32,7$  s), J3 ( $217,3 \pm 107,0$ ) et J7 ( $173,0 \pm 91,1$  s) par rapport à PRE ( $11,7 \pm 7,1$  s) ( $p < 0,001$ ) (**Figure 2.20.A**). Cependant, le TR-PAG diminue significativement à J3 et J7 par rapport à J1 dans le groupe MCAO-J7 ( $p < 0,001$ ), et aussi à J7 par rapport à J3 ( $p < 0,001$ ). Par ailleurs, le TR-PAG est significativement supérieur dans le groupe MCAO-J7 par rapport aux groupes Témoins (PRE= $14,8 \pm 8,3$  s ; J1= $16,3 \pm 12,6$  s ; J3= $7,9 \pm 6,5$  s et J7= $11,9 \pm 13,4$  s) et SHAM (PRE= $13,6 \pm 13,7$  s ; J1= $13,9 \pm 15,5$  s ; J3= $8,8 \pm 4,1$  s et J7= $8,8 \pm 5,8$  s) de J1 à J7 ( $p < 0,001$ ).

**Temps de retrait pour la patte antérieure droite (TR-PAD).** Le TR-PAD augmente significativement dans le groupe MCAO-J7 à J1 ( $73,6 \pm 61,3$  s) et J3 ( $69,6 \pm 105,0$ ) par rapport à PRE ( $15,8 \pm 8,9$  s) ( $p < 0,01$ ) (**Figure 2.20.B**). Cependant, le TR-PAD diminue significativement à J7 ( $22,4 \pm 24,1$  s) par rapport à J1 et J3 dans le groupe MCAO-J7 ( $p < 0,01$ ). Le TR-PAD est significativement supérieur dans le groupe MCAO-J7 par rapport aux groupes Témoins (PRE= $8,4 \pm 9,5$  s ; J1= $8,9 \pm 6,8$  s ; J3= $9,3 \pm 11,3$  s et J7= $7,5 \pm 8,7$  s) et SHAM (PRE= $12,3 \pm 9,4$  s ; J1= $11,4 \pm 8,2$  s ; J3= $6,5 \pm 4,3$  s et J7= $11,6 \pm 8,6$  s) à J1 à J3 ( $p < 0,001$ ).



**Figure 2.20 :** Temps pour retirer la pastille sur la patte antérieure gauche (A) et par la patte antérieure droite (B). \* indique une augmentation significative du TR dans le groupe MCAO à J1, J3 et J7 par rapport à PRE. Φ indique une diminution significative du TR-PAG à J3 et J7 par rapport à J1 et du TR-PAD à J7 par rapport à J1 et J3 pour le groupe MCAO. # indique une diminution significative du TR-PAG à J7 par rapport à J3 pour le groupe MCAO. + indique un TR supérieur pour le groupe MCAO par rapport aux groupes Témoins et SHAM de J1 à J7.

### 3.3.2 Mesures électrophysiologiques

#### *Réponses des afférences métabosensibles suite aux injections de KCl-AL et AL-ATP*

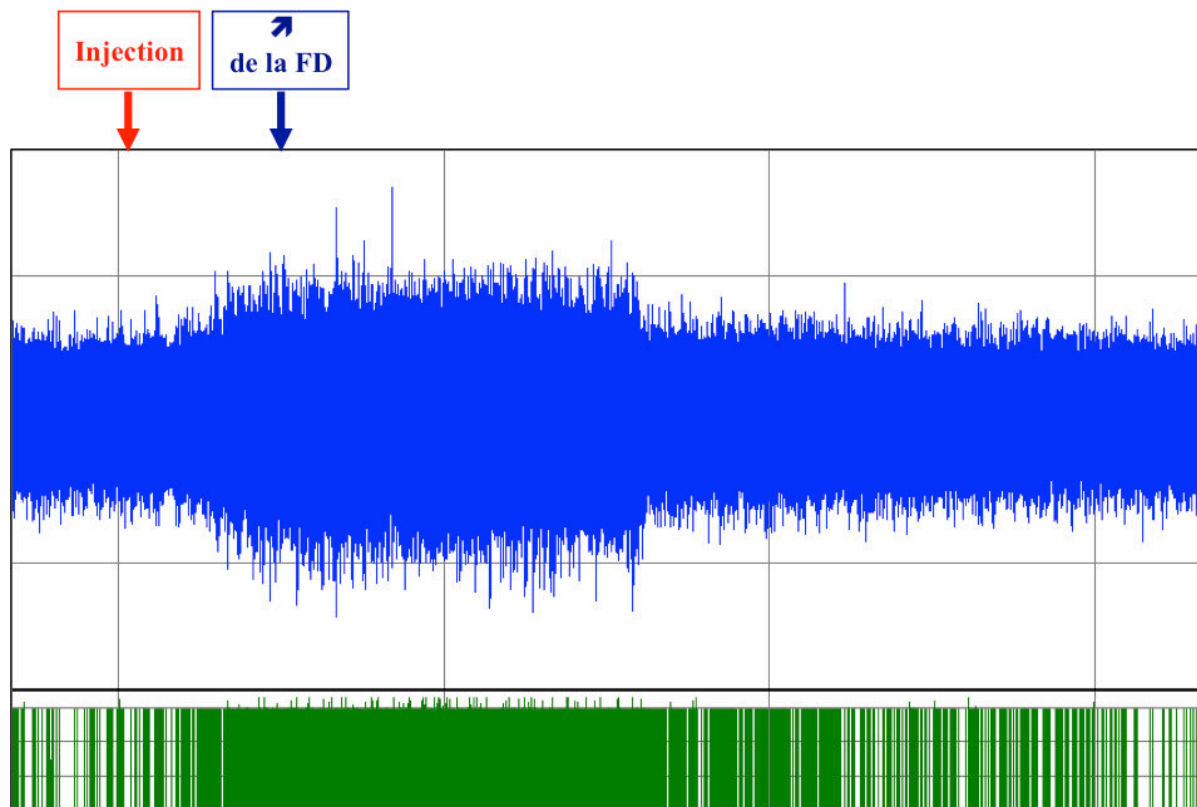
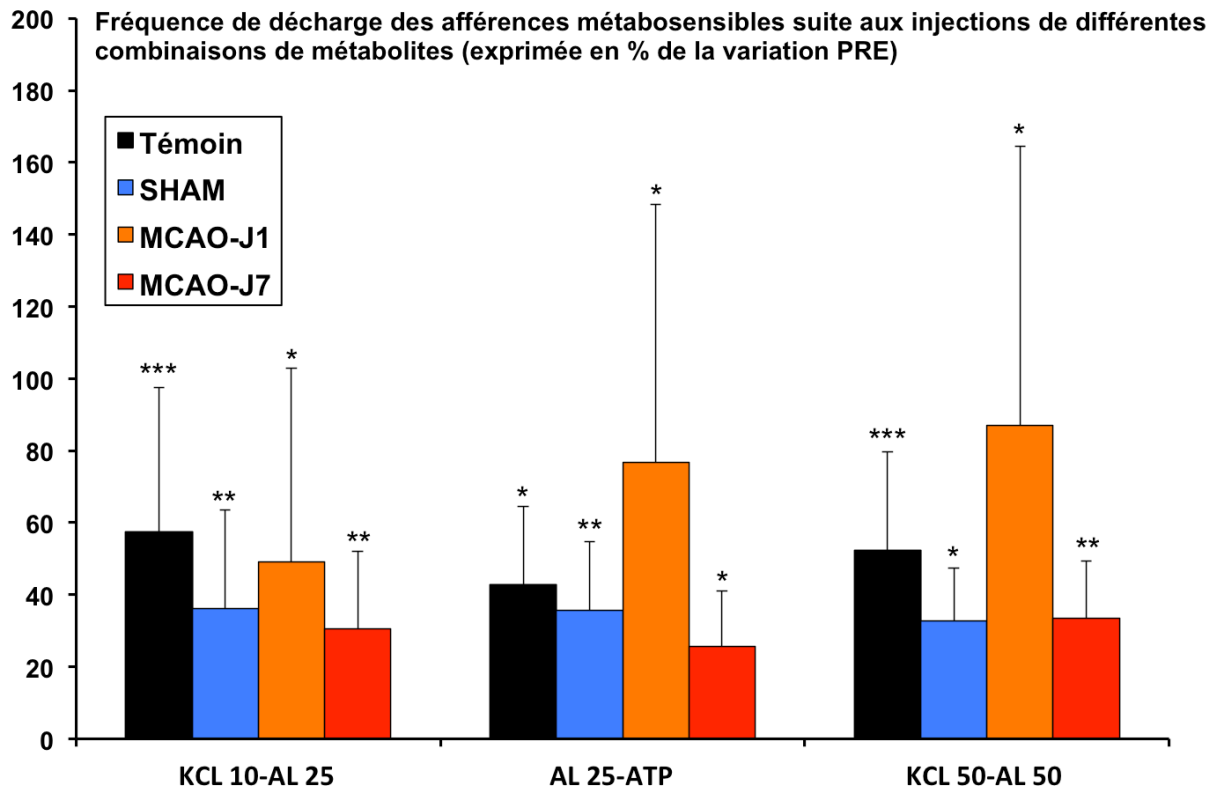
La fréquence de décharge des afférences métabosensibles suite à toutes les injections augmente significativement par rapport à la fréquence de base pour tous les groupes (**Figure 2.21**).

**KCl 10-AL 25.** Témoins (57,4 %±40,1 % ; p<0,001), SHAM (36,2 %±27,5 % ; p<0,01), MCAO-J1 (49 %±54 % ; p<0,05) et MCAO-J7 (30,5 %±21,5 % ; p<0,01).

**AL 25 -ATP.** Témoins (42,8 %±21,8 % ; p<0,05), SHAM (35,6 %±19,2 % ; p<0,01), MCAO-J1 (76,7 %±71,6 % ; p<0,05) et MCAO-J7 (25,7 %±15,4 % ; p<0,05).

**KCl 50-AL 50.** Témoins (52,2 %±27,5 % ; p<0,001), SHAM (32,8 %±14,6 % ; p<0,05), MCAO-J1 (87,1 %±77,5 % ; p<0,05) et MCAO-J7 (33,5 %±15,8 % ; p<0,01).

En revanche, la fréquence de décharge des afférences n'est pas significativement différente entre les groupes Témoins, SHAM, MCAO-J1 et MCAO-J7 suite aux injections des différentes combinaisons de métabolites (**Figure 2.21**).



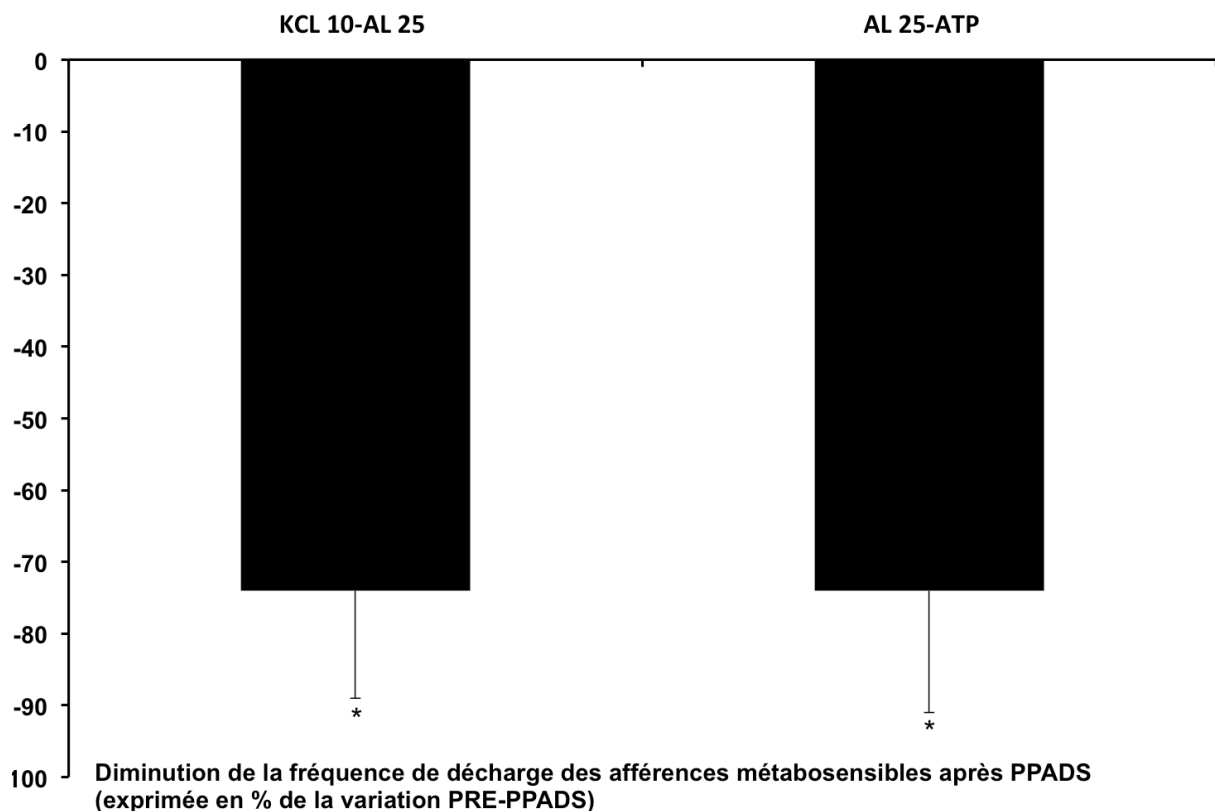
**Figure 2.21 :** Modification de la réponse des afférences métabosensibles suite à l'injection de différentes combinaisons de métabolites. Les valeurs sont exprimées en % de la fréquence de décharge PRE (en haut). \* indique une augmentation de la fréquence de décharge suite aux différentes injections dans les groupes Témoin, SHAM, MCAO-J1 et MCAO-J7. Exemple d'un enregistrement de la fréquence de décharge (FD) des afférences des groupes III et IV suite à l'injection de KCL 50-AL 50 chez un rat du groupe Témoin (en bas).

### *Influence du PPADS sur la réponse des afférences métabosensibles aux injections*

Suite à l'administration de PPADS, la réponse des afférences aux activateurs spécifiques est fortement diminuée comparé à leur réponse obtenu avant l'injection de PPADS (**Figure 2.22**).

**KCl 10-AL 25.** La fréquence de décharge des afférences métabosensibles POST-PPADS est significativement inférieure à la fréquence PRE-PPADS suite à l'injection KCl 10-25 AL (-74 %±15 % ;  $p<0,05$ ).

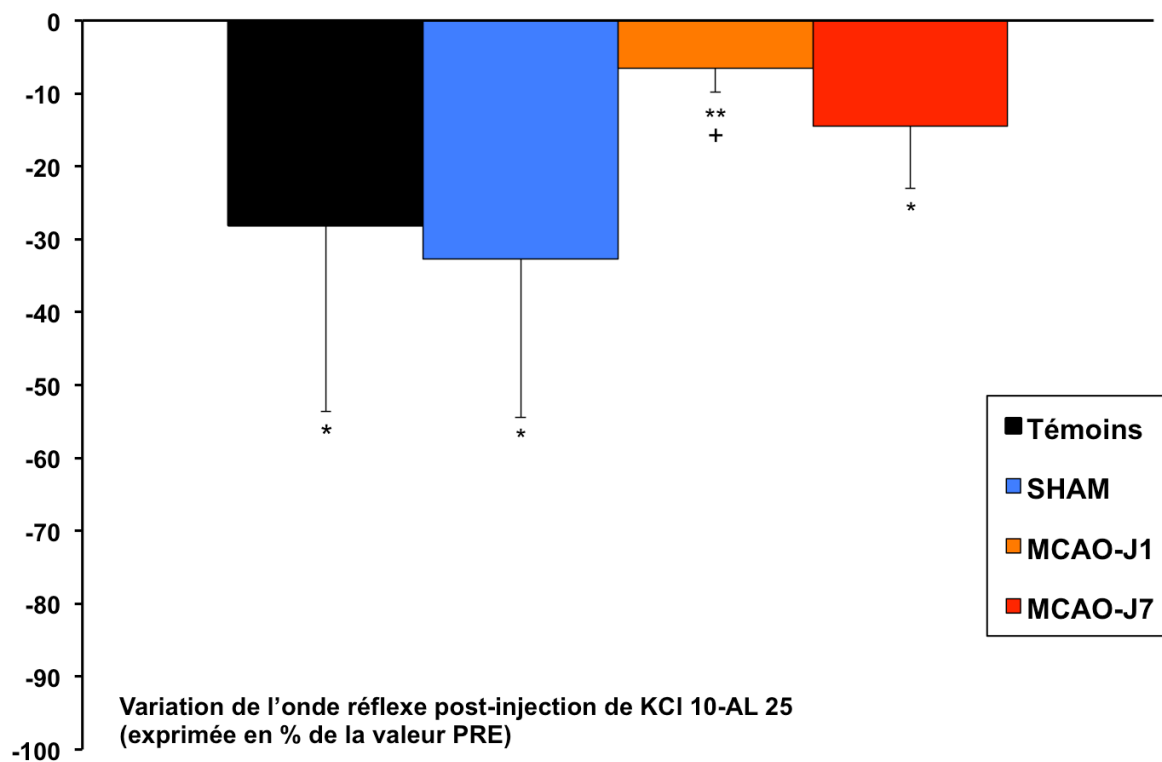
**AL 25-ATP.** La fréquence de décharge des afférences métabosensibles POST-PPADS est significativement inférieure à la fréquence PRE-PPADS suite à l'injection AL 25-ATP (-74 %±17 % ;  $p<0,05$ ).



**Figure 2.22 :** Modification de la réponse des afférences métabosensibles POST-PPADS après injections de métabolites. La valeur est exprimée % de diminution par rapport à la variation PRE-PPADS. \* indique une diminution de la réponse POST-PPADS suite aux injections KCl 10-25 AL et 25 AL-ATP par rapport à la variation PRE-PPADS.

*Réponse du réflexe somatique évoqué suite aux injections de KCl-AL et AL-ATP*

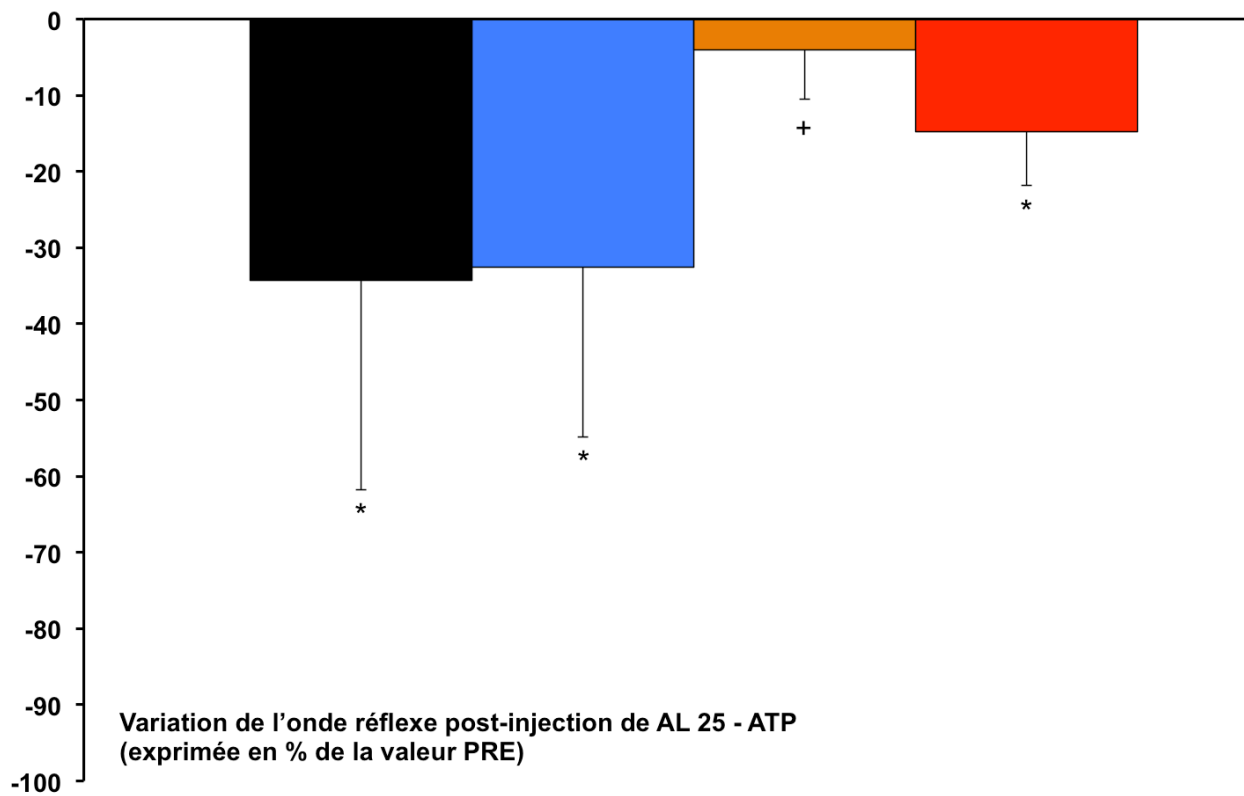
**KCl 10-AL 25.** La réponse du réflexe diminue significativement suite à l'injection KCl 10-AL 25 par rapport au réflexe PRE-injection dans les groupes Témoins (-28 %±25,6 % ; p<0,05), SHAM (-32,8 %±21,7 % ; p<0,05), MCAO-J1 (-6,6 %±3,3 % ; p<0,01) et MCAO-J7 (-14,6 %±8,5 % ; p<0,05). Par ailleurs, la réponse du réflexe est significativement inférieure dans le groupe MCAO-J1 suite à cette injection par rapport au groupes Témoins et SHAM (p<0,05 pour tous). En revanche, il n'y a pas de différence entre MCAO-J1 et MCAO-J7 (**Figure 2.23**).



**Figure 2.23 :** Modification de la réponse du réflexe somatique suite à l'injection KCl 10-AL 25. Les valeurs sont exprimées en % de l'amplitude PRE de l'onde réflexe. \* indique une diminution de la réponse réflexe à l'injection dans les groupes Témoins, SHAM, MCAO-J1 et MCAO-J7. + indique que la réponse réflexe à l'injection pour le groupe MCAO-J1 est inférieure à celle des groupes Témoins et SHAM.

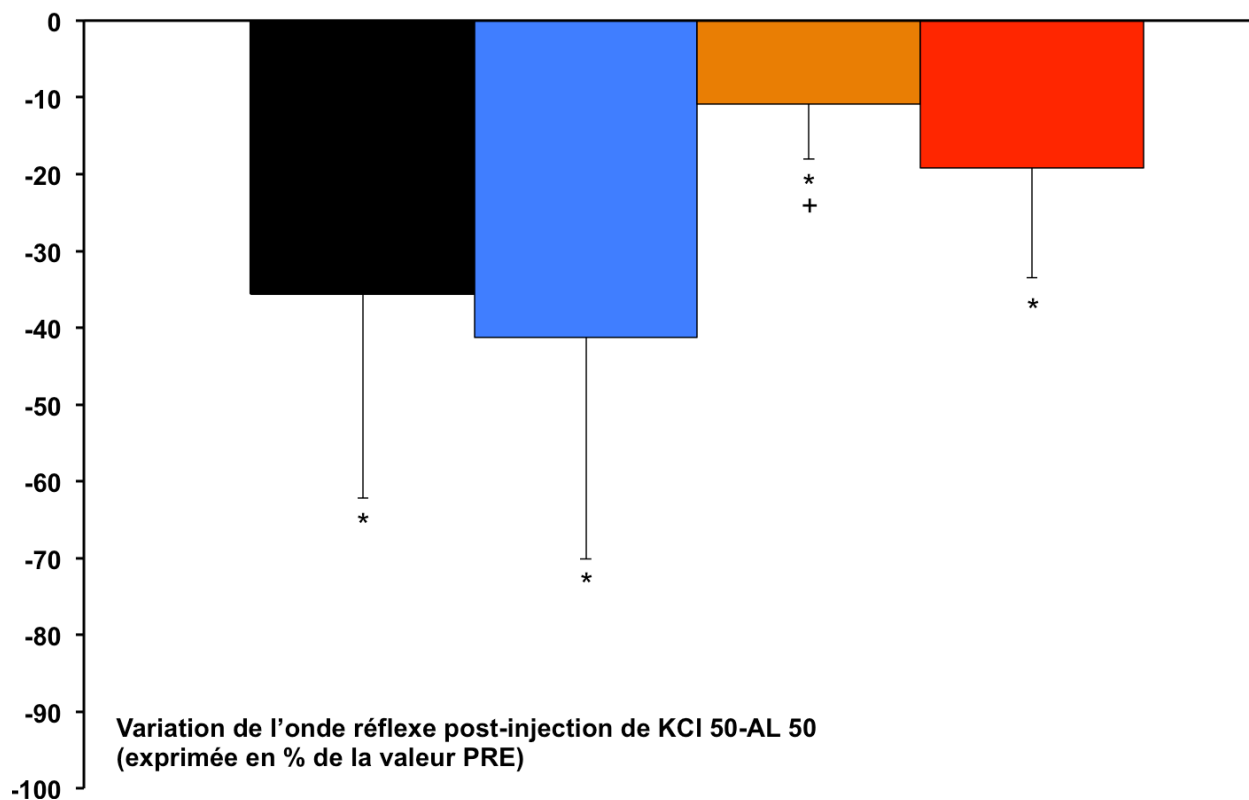


**AL 25-ATP.** La réponse du réflexe diminue significativement suite à l'injection AL 25-ATP par rapport au réflexe PRE-injection dans les groupes Témoins (-34,2 %±27,5 %), SHAM (-32,6 %±22,3 %) et MCAO-J7 (-14,8 %±7,1 %) ( $p < 0,05$  pour tous) contrairement au groupe MCAO-J1 où cette réponse n'est pas diminuée (-4,0 %±6,5 %). De plus, la réponse du réflexe est significativement inférieure dans le groupe MCAO-J1 suite à cette injection par rapport aux groupes Témoins et SHAM ( $p < 0,05$  pour tous) mais il n'y a pas de différence entre MCAO-J1 et MCAO-J7 (**Figure 2.24**). Là encore, la réponse des réflexes est surtout modifiée à J1 chez les animaux lésés.

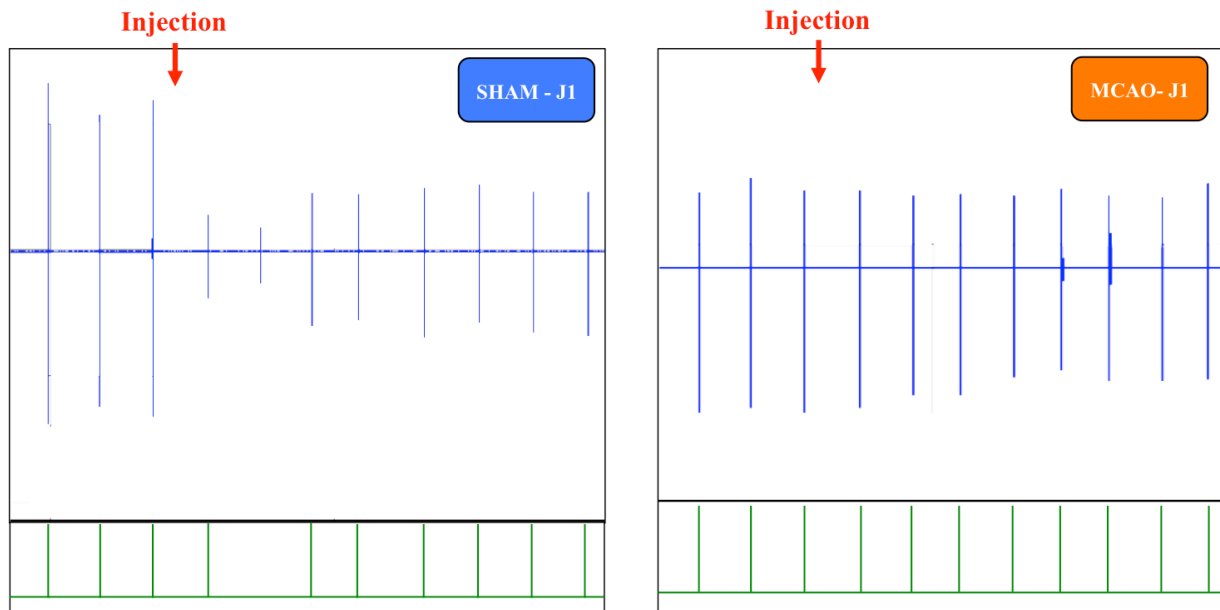


**Figure 2.24 :** Modification de la réponse du réflexe somatique suite à l'injection AL 25-ATP. Les valeurs sont exprimées en % de l'amplitude PRE de l'onde réflexe. \* indique une diminution de la réponse réflexe à l'injection dans les groupes Témoins, SHAM, et MCAO-J7. + indique que la réponse réflexe à l'injection pour le groupe MCAO-J1 est inférieure à celle des groupes Témoins et SHAM.

**KCl 50-AL 50.** La réponse du réflexe diminue significativement suite à l'injection KCl 50-AL 50 par rapport au réflexe PRE-injection dans le groupe Témoins (-35,5 %±26,7 %), SHAM (-41,2 %±28,9 %) et MCAO-J7 (-19,2 %±14,2 %) ( $p < 0,05$  pour tous) contrairement au groupe MCAO-J1 où cette réponse n'est pas modifiée (-10,9 %±7,1 %). De plus, la réponse du réflexe est significativement inférieure dans le groupe MCAO-J1 suite à cette injection par rapport aux groupes Témoins et SHAM ( $p < 0,05$  pour tous). En revanche, il n'y a pas de différence entre MCAO-J1 et MCAO-J7 (**Figure 2.25**). La réponse du réflexe aux injections est atténuée à J1 par rapport aux groupes d'animaux non-lésés. Un exemple de l'enregistrement de réflexes somatiques est présenté dans la **Figure 2.26 - p.169**.



**Figure 2.25 :** Modification de la réponse du réflexe somatique suite à l'injection KCl 50-AL 50. Les valeurs sont exprimées en % de l'amplitude PRE de l'onde réflexe. \* indique une diminution de la réponse réflexe à l'injection dans les groupes Témoins, SHAM, et MCAO-J7. + indique que la réponse réflexe à l'injection pour le groupe MCAO-J1 est inférieure à celle des groupes Témoins et SHAM.

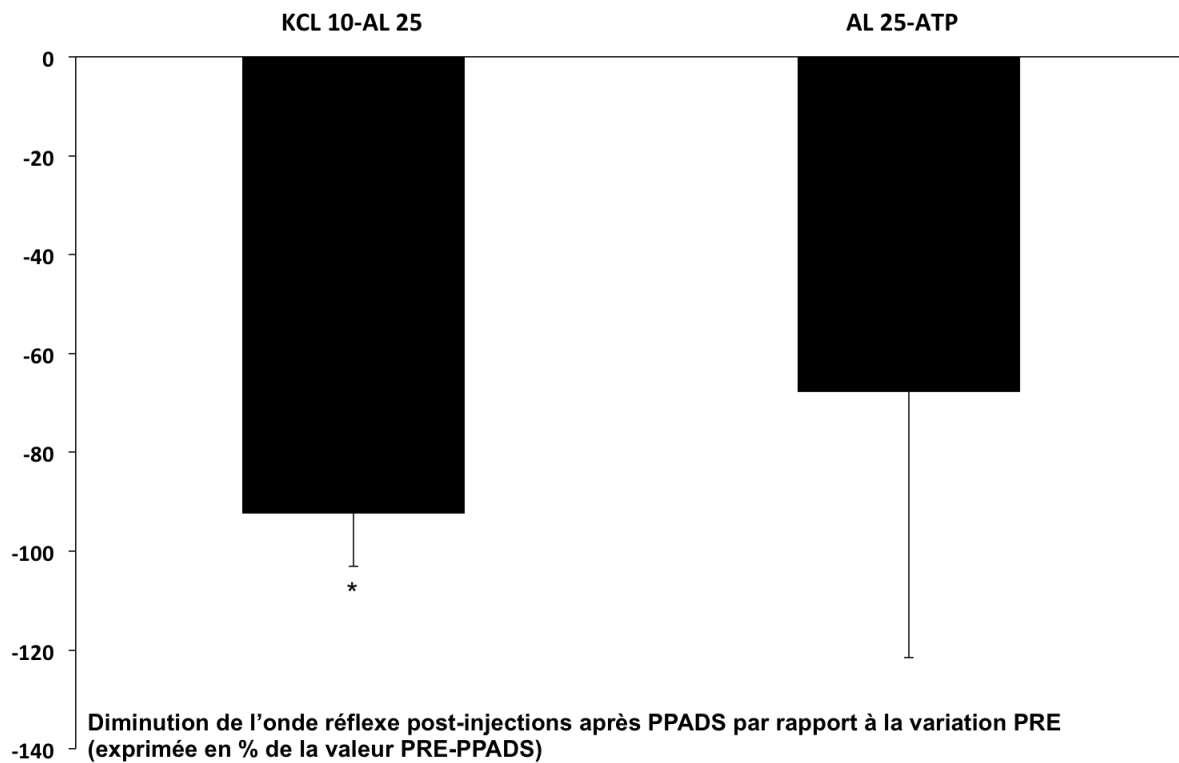


**Figure 2.26 :** Exemple de la réponse des réflexes somatiques suite à l'activation des afférences des groupes III et IV chez un rat du groupe SHAM et MCAO-J1. Nous pouvons constater que l'amplitude du réflexe somatique ne varie pas suite à l'injection de métabolites chez le rat MCAO-J1 contrairement à celle du rat SHAM.

### *Influence du PPADS sur la réponse du réflexe somatique aux injections*

**KCI 10-AL 25.** L'amplitude du réflexe POST-PPADS est significativement inférieure à celle évoquée à PRE-PPADS post-injection ( $-92 \% \pm 11 \% ; p < 0,05$ ) (**Figure 2.27**).

**AL 25-ATP.** L'amplitude du réflexe POST-PPADS n'est pas significativement modifiée par rapport à PRE-PPADS post-injection malgré une diminution de la réponse relativement importante ( $-68 \% \pm 54 \%$ ).



**Figure 2.27 :** Modification du réflexe POST-PPADS après injections de métabolites. La valeur est exprimée % de diminution par rapport à la variation PRE-PPADS. \* indique une diminution du réflexe POST-PPADS suite à l'injections KCl 10-25 AL par rapport à la variation PRE-PPADS.

### Réponse du noyau VPL ipsilatéral (IP) suite aux injections de métabolites

La variation de la fréquence de décharge du VPL ipsilatéral suite à toutes les injections augmente significativement par rapport à PHY pour tous les groupes (**Figure 2.28**).

**KCl 10-AL 25.** Témoins ( $40 \% \pm 14 \% ; p < 0,001$ ), SHAM ( $40 \% \pm 28 \% ; p < 0,05$ ), et MCAO-J7 ( $45 \% \pm 28 \% ; p < 0,05$ ).

**AL 25 -ATP.** Témoins ( $38 \% \pm 24 \% ; p < 0,01$ ), SHAM ( $49 \% \pm 13 \% ; p < 0,05$ ), et MCAO-J7 ( $53 \% \pm 60 \% ; p < 0,01$ ).

**KCl 50-AL 50.** Témoins ( $73 \% \pm 47 \% ; p < 0,05$ ), SHAM ( $79 \% \pm 43 \% ; p < 0,05$ ) et MCAO-J7 ( $89 \% \pm 25 \% ; p < 0,01$ ).

**Ratio IP/IP-PHY.** En revanche, aucune différence n'est observée entre les groupes pour le ratio IP/IP-PHY pour toutes les injections : KCl 10-AL 50 (Témoins :  $1,33 \pm 0,19$  ; SHAM :  $1,24 \pm 0,33$  ; MCAO-J7 :  $1,35 \pm 0,35$ ) ; AL 25-ATP (Témoins :  $1,30 \pm 0,26$  ; SHAM :

1,22±0,30 ; MCAO-J7 : 1,53±0,60) ; KCl 50-AL 50 (Témoins : 1,65±0,50 ; SHAM : 1,48±0,54 ; MCAO-J7 : 1,58±0,52).

### *Réponses du noyau VPL controlatéral (CT) suite aux injections de métabolites*

La variation de la fréquence de décharge du VPL controlatéral suite à toutes les injections augmente significativement par rapport à PHY pour tous les groupes (**Figure 2.28**).

**KCl 10-AL 25.** Témoins (44 %±24 % ; p<0,001), SHAM (67 %±41 % ; p<0,05), et MCAO-J7 (55 %±36 % ; p<0,01).

**AL 25 -ATP.** Témoins (41 %±17 % ; p<0,01), SHAM (45 %±29 % ; p<0,05), et MCAO-J7 (36 %±14 % ; p<0,05).

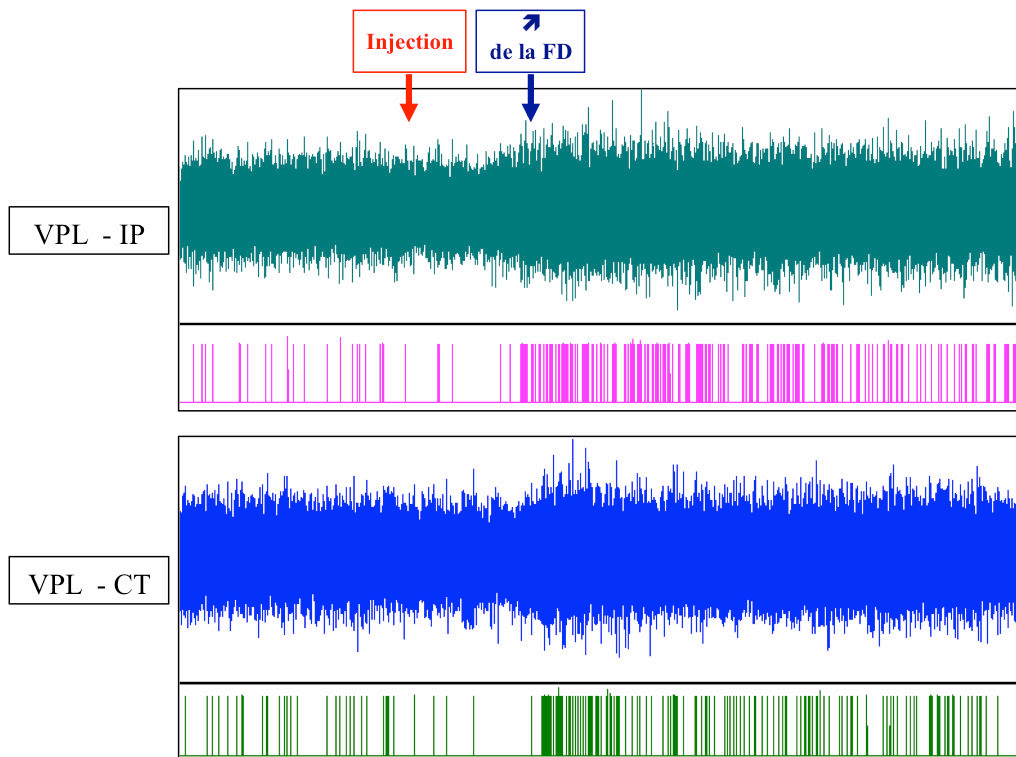
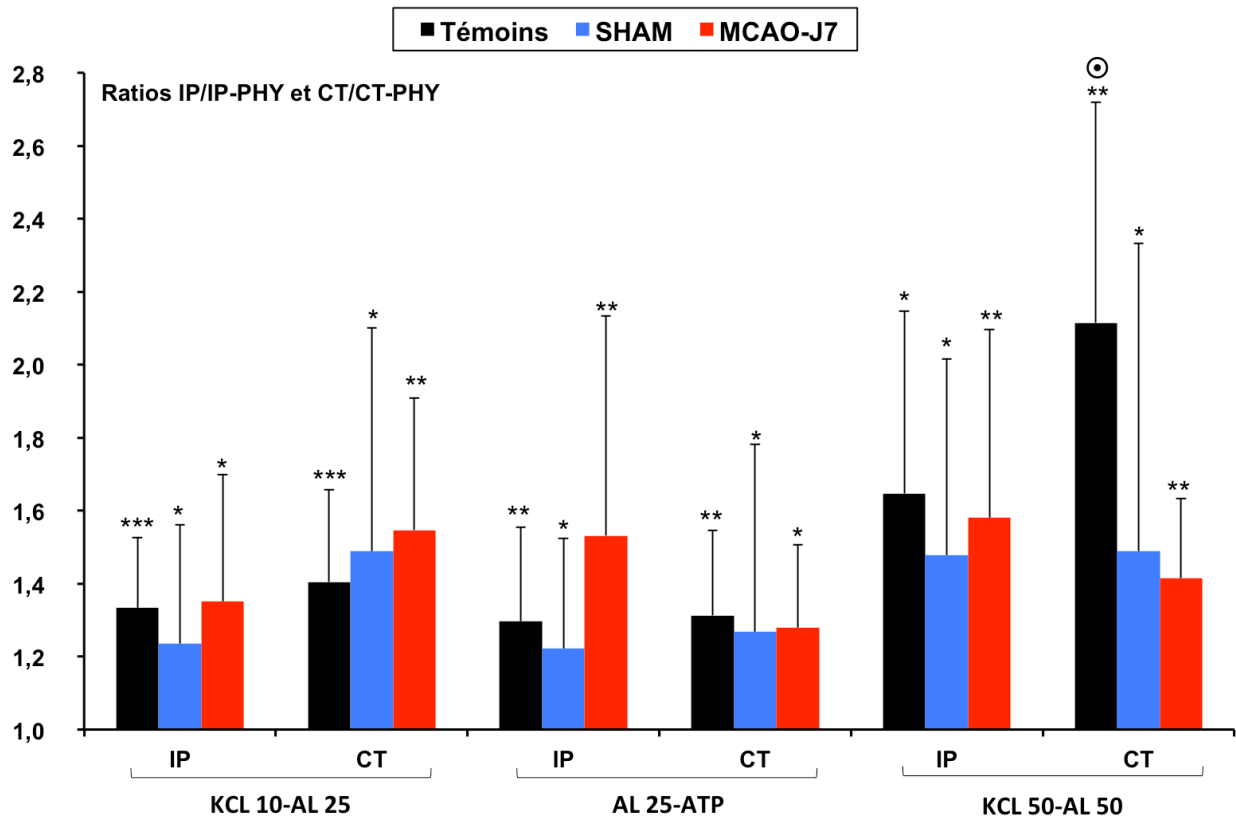
**KCl 50-AL 50.** Témoins (98 %±52 % ; p<0,01), SHAM (46 %±36 % ; p<0,05) et MCAO-J7 (41 %±22 % ; p<0,01).

**Ratio CT/CT-PHY.** En revanche, aucune différence n'est observée entre les groupes pour le ratio CT/CT-PHY pour toutes les injections : KCl 10-AL 50 (Témoins : 1,40±0,26 ; SHAM : 1,49±0,61 ; MCAO-J7 : 1,55±0,36) ; AL 25-ATP (Témoins : 1,31±0,23 ; SHAM : 1,27±0,51 ; MCAO-J7 : 1,28±0,23) ; KCl 50-AL 50 (Témoins : 2,11±0,60 ; SHAM : 1,49±0,84 ; MCAO-J7 : 1,41±0,22).

### *Comparaison entre la réponse du noyau VPL controlatéral et celle du noyau VPL ipsilatéral suite aux injections de métabolites*

Aucune différence n'est observée entre le ratio IP/PHY et le ratio CT/PHY pour les groupes SHAM et MCAO-J7 et ce, pour toutes les injections. De même pour le groupe Témoins, aucune différence n'est observée pour les injections KCl 10-AL 25 et AL 25-ATP.

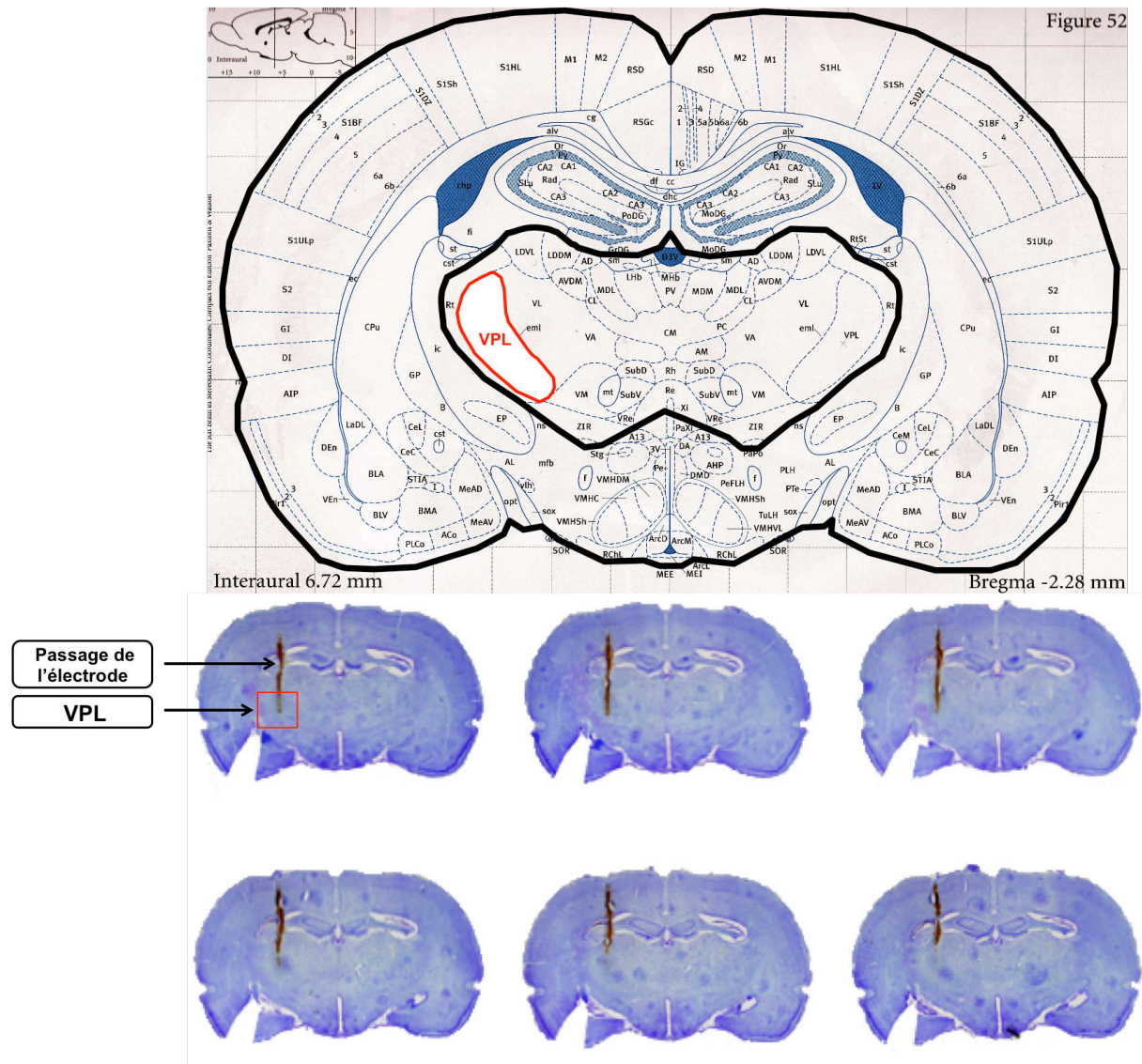
En revanche, le ratio IP/PHY est significativement inférieur au ratio CT/PHY dans le groupe Témoins en réponse à l'injection KCl 50-AL 50 uniquement (p<0,05).



**Figure 2.28 : Modification de la réponse du noyau VPL ipsi- et controlatéral suite à l'injection de différentes combinaisons de métabolites.** Les valeurs sont exprimées en ratio IP-POST/IP-PRE et CT-POST/CT-PRE (en haut). \* indique une augmentation de la fréquence de décharge suite aux différentes injections dans les groupes Témoins, SHAM, MCAO-J1 et MCAO-J7. ⊙ indique une fréquence de décharge supérieure pour le VPL controlatéral par rapport à la fréquence de décharge du VPL ipsilatéral chez le groupe Témoins suite à l'injection KCL 50-AL 50. Exemple d'un enregistrement de la fréquence de décharge (FD) des VPL ipsi- et controlatéral après l'activation des afférences du groupes III et IV chez un rat du groupe Témoins (en bas). IP : ipsilatéral ; CT : controlatéral.

### 3.3.3 Analyses histologiques : évaluation de la taille de la lésion et vérification de l'emplacement des électrodes dans le thalamus

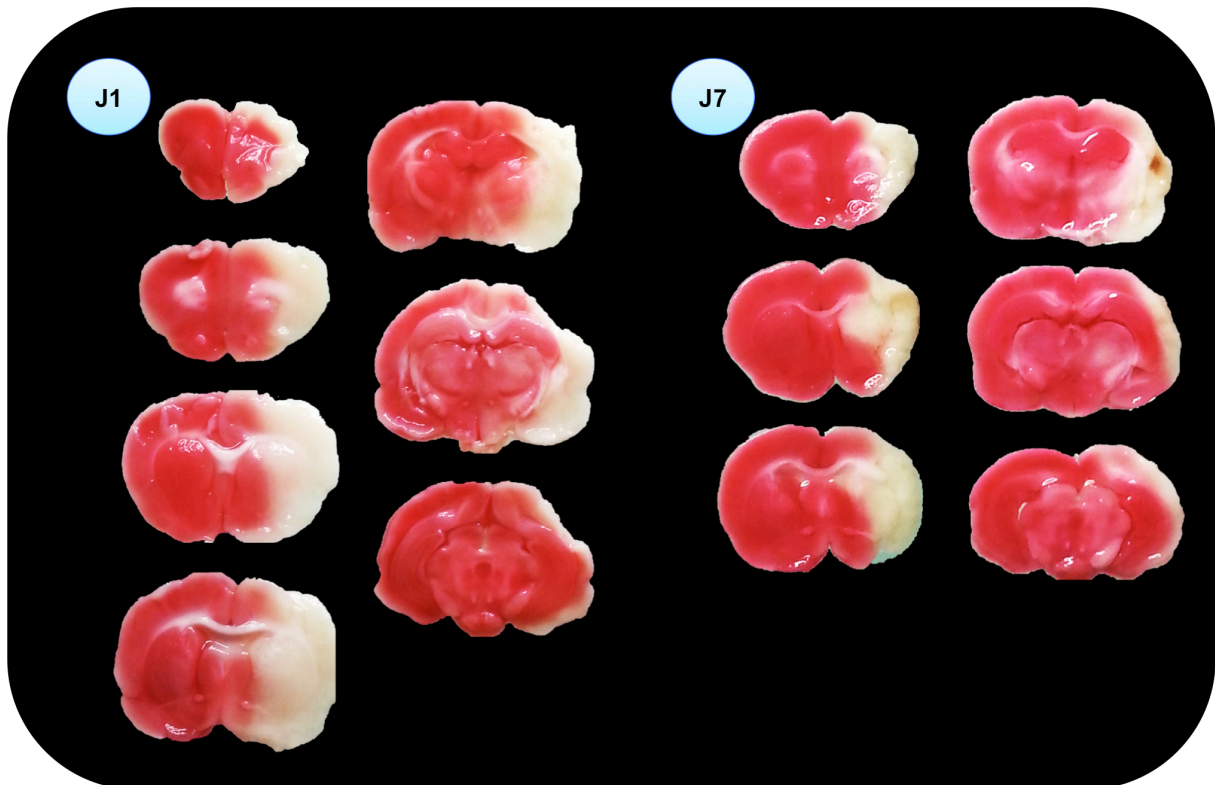
#### Coloration au crésyl violet



**Figure 2.29 :** Illustration de coupes de cerveau d'un même animal, colorées avec du crésyl violet mettant en évidence l'emplacement des électrodes dans le thalamus et plus précisément dans le VPL. Le thalamus est démarqué par le trait noir en gras au sein du cerveau.

*Coloration au TTC*

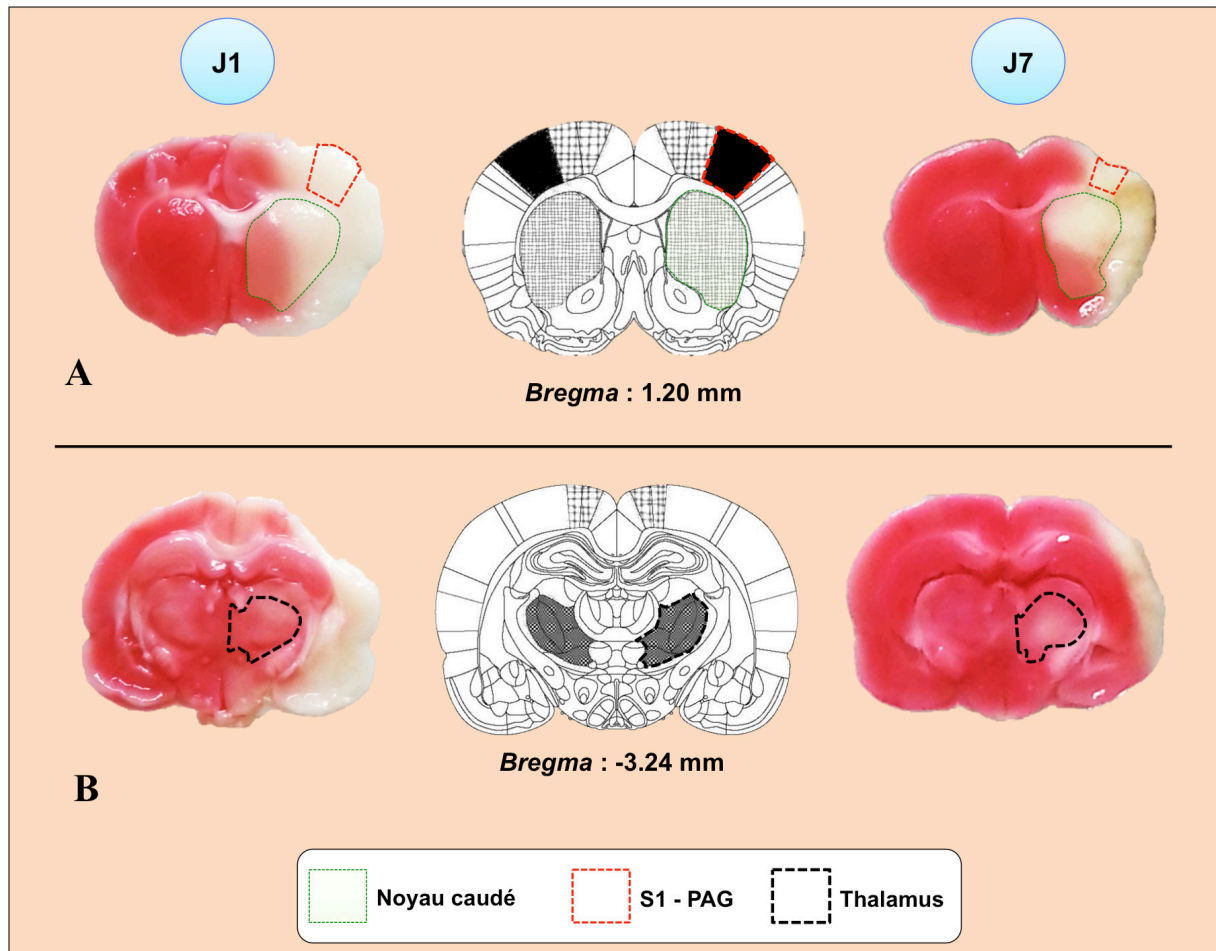
La taille de la lésion ischémique représente  $29\% \pm 7\%$  du cerveau total et  $56\% \pm 12\%$  de l'hémisphère droit à J1. À J7, la taille de la lésion constitue  $25\%$  du cerveau total et  $53\%$  de l'hémisphère droit (**Figure 2.30**).



**Figure 2.30** : Illustration de coupes de cerveau colorées avec du TTC mettant en évidence la taille de la lésion sur un rat sacrifié un jour (J1) et un autre 7 jours (J7) après la MCAo-r.



D'un point de vu qualitatif, nous pouvons voir que la lésion cérébrale affecte le cortex somatosensoriel et une partie du striatum (**Figure 2.31.A**). Nous pouvons également constater que le thalamus n'est pas affecté par l'ischémie aussi bien à J1 qu'à J7 (**Figure 2.31.B**).



**Figure 2.31** : Illustration de quelques structures cérébrales touchées par l'ischémie cérébrale induite par la MCAo-r. D'après l'atlas de Paxinos & Watson, 2006, nous pouvons constater que (A) le noyau caudé (striatum) et l'aire somatosensorielle primaire de la patte antérieure gauche (S1 – PAG) sont affectés par l'ischémie aussi bien à J1 qu'à J7. En revanche, (B) le thalamus semble intact.

### 3.4 Discussion de l'étude n°2

#### *L'action inhibitrice des afférences métabosensibles sur la régulation des réflexes somatiques est perturbée après l'ischémie cérébrale.*

Cette étude rapporte que l'action des afférences musculaires des groupes III et IV peut être modifiée au niveau de la moelle épinière suite à une ischémie cérébrale confirmant l'hypothèse mise en avant dans l'étude n°1 (Pin-Barre *et al.*, 2014). Ce phénomène a été mis en évidence en montrant que ces afférences ne régulent plus l'activité des réflexes somatiques après l'ischémie car leur activation entraîne une moindre diminution de l'amplitude du réflexe. Nous avons suggéré que cette perturbation de l'action des afférences pourrait provenir d'une modification de la réponse de ces afférences à leurs stimuli chimiques. Or, ce travail démontre que la réponse des afférences n'est pas modifiée dans la phase aiguë de l'ischémie cérébrale lorsque leurs activateurs chimiques spécifiques sont appliqués. Bien que l'atrophie musculaire et le changement de myotypologie ne sont visibles qu'à partir de quelques jours après une ischémie cérébrale (Chang *et al.*, 2010), les mesures effectuées à 7 jours ne montrent pas de différence par rapport à J1. Pourtant, l'atrophie musculaire et les modifications de la myotypologie peuvent jouer sur l'activité des afférences musculaires métabosensibles (Mancini *et al.*, 1992). Il semblerait donc que la première semaine reste encore trop précoce pour déceler une éventuelle différence au niveau de la réponse des afférences musculaires. Il pourrait alors être envisagé que la réponse des afférences soit perturbée dans une phase plus tardive comme cela a été vu après un infarctus du myocarde chez le rat (Wang *et al.*, 2010a). De plus, deux études précédentes montrent que la réponse des afférences du groupe III (augmentation) est différente de celle des afférences du groupe IV (diminution) suite à un infarctus de myocarde (Wang *et al.*, 2010a, 2012b). Si les animaux présentant une ischémie cérébrale montre le même profil de réponse qu'après un infarctus du myocarde, cet effet pourrait être masqué dans notre étude car nous avons mesuré

simultanément les afférences des groupes III et IV en réponse à leurs stimuli chimiques communs. Une analyse immunohistologique au niveau des ganglions dorsaux pourrait détecter cette différence (Wang *et al.*, 2010b, 2010a, 2012a; Osteen *et al.*, 2016).

Étant donné que ces fibres sensorielles déchargent de manière similaire à celles des animaux contrôles (Témoins et SHAM), la perturbation des réflexes observée ne semble pas liée à une moindre réponse de ces afférences. Il est donc suggéré que l'action des afférences des groupes III et IV est perturbée au niveau de la transmission synaptique entre les afférences de gros diamètres (groupe Ia) et les motoneurones- $\alpha$  dans la moelle épinière. Il n'est malheureusement pas possible de définir précisément d'où provient cette perturbation, c'est-à-dire, au niveau pré- ou post-synaptique ? Il est suggéré ici avec précaution qu'un changement de l'activité des voies motrices descendantes liée à l'ischémie cérébrale pourrait perturber l'action des afférences métabosensibles au niveau pré-synaptique des afférences Ia (Iles & Pisini, 1992). D'autres études sont donc nécessaires pour éclaircir ce mécanisme de régulation. Néanmoins, nos résultats suggèrent que la modification de la régulation induite par les afférences métabosensibles pourrait partiellement expliquer la fatigue précoce observée dans la phase aiguë de l'ischémie cérébrale dans le chapitre 1.

D'un point de vue méthodologique, les combinaisons d'agents chimiques injectés (KCl, AL et ATP) activent principalement les afférences musculaires des groupes III et IV car la réponse des afférences est fortement diminuée lorsque le PPADS, un antagoniste des récepteurs P2X, est administré au niveau musculaire. Ce résultat est en accord avec plusieurs études antérieures (Hanna, 2003). Pour nos animaux lésés, il est supposé que les récepteurs P2X ne sont pas affectés par l'ischémie cérébrale puisque les afférences semblent décharger de manière similaire aux animaux contrôles. Par ailleurs, l'amplitude des réflexes n'est plus modifiée par les activateurs chimiques des afférences métabosensibles ce qui renforce dans un premier temps des résultats antérieurs montrant que les afférences métabosensibles sont bien

impliquées dans la régulation des réflexes spinaux (Pettorossi *et al.*, 1999; Laurin *et al.*, 2010, 2016). De plus, la présente étude rajoute que l'activité des récepteurs P2X peut influencer la régulation des réflexes somatiques spinaux ce qui n'avait jamais été mis en avant à notre connaissance.

### *L'activation des afférences métabosensibles induit une activité bilatérale du thalamus pour tous les animaux.*

Les résultats observés au niveau du thalamus peuvent être considérés comme des résultats préliminaires. Cette étude est la première à montrer une augmentation de la fréquence de décharge dans le VPL du thalamus après une injection spécifique aux afférences des groupes III et IV. De manière surprenante, la réponse observée a fréquemment été bilatérale. Il n'y a pas de point de comparaison direct dans la littérature ce qui rend l'interprétation de ces résultats plus délicate. Nous avons supposé que la réponse aux injections dans le thalamus serait observée au niveau controlatéral à l'injection mais aussi que l'ischémie cérébrale provoquerait une réponse bilatérale. Pour le 2<sup>ème</sup> point, cela a été observé pour d'autres types de stimulations sensibles reflétant une incapacité des mécanismes de compensation à restaurer une activation latéralisée suite à une stimulation sensitive (Cramer *et al.*, 1997; Murphy & Corbett, 2009). En revanche, nous avons observé seulement pour l'injection la plus forte que la réponse du VPL controlatéral est plus importante que celle du côté ipsilatéral chez les témoins uniquement. Ce résultat indique que la réponse est tout de même plus bilatéralisée chez les animaux lésés mais ce résultat est à prendre avec beaucoup de précaution. La réponse des SHAM n'est pas différente de celles des animaux lésés. Ce résultat reste à ce jour difficile à interpréter mais nous suggérons que cela peut être lié à la variabilité des réponses observées dans ce groupe. Il paraît donc important de s'interroger sur la méthodologie employée dans notre étude. Nos expérimentations ont bien montré une

réponse dans le thalamus suite à l'activation des afférences musculaires ce qui n'est pas le cas lorsque du sérum physiologique est injecté. Cependant, il se pourrait que les concentrations soient suffisamment importantes pour solliciter les voies contralatérales mais aussi les voies ipsilatérales qui seraient silencieuses à des concentrations plus faibles. Il faudrait donc vérifier à partir de quelles concentrations la réponse devient bilatérale chez des animaux sains dans un premier temps puis chez des animaux lésés. Cela n'a pas été envisagé au cours de cette étude car nous voulions déjà répondre à la question concernant les mesures du thalamus : est que l'activation des afférences métabosensibles peut être détectée dans le VPL ? Ceci est bien le cas dans notre étude mais il n'est pas possible de détecter de différences (éventuelles) entre les animaux lésés et non-lésés car la variabilité des réponses observées dans le noyau est assez importante. Néanmoins, nos résultats suggèrent que le VPL répond aux stimuli chimiques originaires principalement des muscles squelettiques. D'un point de vue méthodologique, la coloration au crésyl violet des coupes de cerveau montre que les électrodes d'enregistrement sont bien localisées au niveau du VPL du thalamus.

### *La taille de la lésion n'est pas modifiée entre J1 et J7 quelque soit la méthode de coloration utilisée.*

La coloration des tissus cérébraux avec le TTC confirme que l'ischémie cérébrale de 2 h induit une lésion cérébrale reproductible à J1. Ainsi, nous pouvons considérer que les déficits fonctionnels observés ainsi que les perturbations de la réponse du réflexe somatique aux injections chez les animaux lésés sont bien consécutifs à l'ischémie cérébrale. Cependant, la taille de la lésion n'évolue pas entre J1 et J7 ce qui est en accord avec notre 1<sup>ère</sup> étude (Pin-Barre *et al.*, 2014). Par ailleurs, le thalamus ne présente pas d'atteinte tissulaire, contrairement au complexe noyau caudé/putamen (striatum) et au cortex somatosensoriel qui sont communément affectées suite à 2 h de MCAo-r (Carmichael, 2005; Paxinos & Watson, 2006;

Sicard & Fisher, 2009; Popp *et al.*, 2009; Uluç *et al.*, 2011). Étant donné que le volume lésionnel n'évolue pas au cours du protocole, il est suggéré que la récupération fonctionnelle, dont nous allons discuter maintenant, dépendrait des mécanismes de plasticité (structuraux et fonctionnels) se déroulant, partiellement, en dehors des zones nerveuses directement lésées (Murphy & Corbett, 2009).

### *L'ischémie cérébrale induit une perturbation de la sensibilité mécanique de la patte du côté controlésionnel.*

L'ischémie cérébrale induit une perte de la sensibilité tactile au niveau de la patte antérieure gauche (parétique) reflétée par une augmentation du temps pour détecter la pastille au niveau de cette patte. L'altération de cette fonction semble maximale 1 jour post-ischémique mais persiste durant 7 jours. Des études précédentes ont mis en avant une extinction tactile en utilisant différemment ce test car le même type de stimulus est appliqué simultanément des 2 côtés. Ils ont montré une incapacité à détecter une stimulation tactile au niveau du côté parétique (Andersen *et al.*, 1991; Modo *et al.*, 2000). De même, l'ischémie cérébrale entraîne une augmentation du temps pour retirer la pastille au niveau de la patte parétique chez les animaux du groupe MCAO-J7 démontrant la présence de troubles de la coordination motrice. En revanche, une récupération spontanée progressive est observée tout au long de la semaine post-chirurgie bien que celle-ci reste incomplète.

Concernant la patte antérieure droite (non parétique), les données indiquent des troubles de la sensibilité post-ischémique. Une fois encore, le temps pour détecter la pastille est plus élevé chez les animaux lésés à partir du 1<sup>er</sup> jour et persiste durant toute la semaine post-MCAO-r. Une altération de la sensibilité bilatérale est fréquemment relevée dès lors que l'occlusion cérébrale est de 60 min minimum (Freret *et al.*, 2006). Pour terminer, les données du temps de retrait suggèrent des déficits moteurs au niveau de cette patte non-lésée durant les

3 premiers jours suivant l'ischémie cérébrale. En revanche, ces déficits se dissipent à la fin de la semaine.

La perte de sensibilité tactile chez nos animaux lésés est confirmée par les résultats obtenus avec le test du Von Frey électronique où le seuil à la sensibilité mécanique à la pression au niveau de la patte parétique est augmenté. À notre connaissance, aucune autre étude n'a évalué la sensibilité mécanique à la pression à partir du Von Frey électronique après une ischémie cérébrale de 2 h au niveau de l'ACM. Ces observations sont en contradiction avec des travaux précédents, où ce test est utilisé pour évaluer l'hypersensibilité tactile et/ou l'allodynie, illustrée par une baisse du seuil mécanique à la pression, dans les modèles de douleurs neuropathiques suite à une ischémie cérébrale globale ou focale du thalamus (Yang *et al.*, 2014; Matsuura *et al.*, 2016a, 2016b). Nos résultats suggèrent donc qu'une lésion induite par la méthode de la MCAo-r ne semble pas causer de douleurs neuropathiques. Ceci semble concorder avec nos résultats en électrophysiologie puisque nous avons montré que la réponse des afférences musculaires des groupes III et IV, conduisant également les informations nociceptives, n'était pas augmentée suite à l'ischémie cérébrale. De même, les résultats obtenus sur le thalamus, connus pour traiter les informations nociceptives, indiquent que ce dernier ne semble ni structurellement ni fonctionnellement affecté par l'ischémie renforçant encore nos observations faites sur le test du Von frey.

En revanche, contrairement aux observations faites avec le test du ruban adhésif, le test du Von Frey n'a détecté aucune perturbation de la sensibilité mécanique de la patte antérieure droite suite à l'ischémie cérébrale. Cela peut être expliqué par le fait que le test du Von Frey permet de mesurer la sensibilité tactile fine (plus précise) et de manière très ciblée alors que l'application de la pastille induit une sensation tactile superficielle et diffuse, plus complexe à détecter. Il est intéressant de souligner que les déficits sensorimoteurs observés dans notre étude ne semblent pas liés à une perturbation de l'activité thalamique dans la phase

aigüe de l'ischémie cérébrale car il a été suggéré qu'une lésion indirecte du thalamus contribuerait modérément aux déficits sensorimoteurs seulement sur le long terme (Freret *et al.*, 2006).

### ***3.5 Conclusion de l'axe 1 et ouverture sur l'axe 2***

Les résultats de cette étude confirment que l'ischémie cérébrale induit au cours de la phase aigüe (1<sup>ère</sup> semaine post), une perturbation de la régulation de l'activité réflexe au niveau spinal (reflétée par une moindre diminution de l'amplitude des réflexes somatiques). De manière complémentaire à l'étude n°1, la présente étude renforce l'idée que cette perturbation a lieu lorsque les afférences métabosensibles sont spécifiquement activées et semble suggérer que leur action inhibitrice des réflexes somatiques n'est plus aussi marquante après une ischémie cérébrale. Il semblerait que la balance excitation-inhibition soit perturbée au niveau de la moelle épinière en ce qui concerne le recrutement motoneuronal par les voies réflexes. Au vu du rôle de ces afférences dans la régulation de la fatigue, ces observations nous permettent de suggérer avec précaution, que l'altération de l'action des afférences métabosensibles pourrait partiellement être à l'origine de la fatigue musculaire précoce observée dans l'étude n°1 chez nos animaux lésés. La présente étude précise également que l'activation des afférences métabosensibles et que leur impact dans le thalamus ne paraît pas être affectée par la lésion. Ces deux études révèlent ainsi que la plasticité au sein de la moelle épinière constitue un paramètre non-négligeable de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale pouvant contribuer aux déficits sensorimoteurs. Plusieurs pistes seront proposées en conclusion générale/perspectives pour faire suite à ce travail.



### *3.5 Conclusion de l'axe 1 et ouverture sur l'axe 2 (suite)*

L'étude des stratégies thérapeutiques employées pour réduire les conséquences délétères de l'AVC constitue un axe complémentaire tout aussi important que celui dédié à la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie. Pour cette raison, la suite de ce travail de thèse représentant l'axe 2 porte sur l'intérêt de l'exercice d'endurance en tant qu'outil de rééducation post-ischémique. Bien que l'exercice d'endurance représente un moyen prometteur pour optimiser la qualité de vie des patients AVC, les preuves de l'efficacité des différents programmes d'entraînement, caractérisés par les paramètres d'exercice choisis, manquent à ce jour. L'intensité d'exercice est un paramètre d'exercice crucial de l'efficacité d'un entraînement. Que ce soit chez le patient AVC ou l'animal, la plupart des études emploient des intensités d'exercice considérées comme modérées (car recommandées). Cependant, de récents travaux indiquent que les exercices de hautes intensités seraient potentiellement plus bénéfiques et faisables mais aucune preuve n'a permis de déterminer le rôle précis des exercices de hautes intensités dans le cadre de l'ischémie cérébrale. Ceci constituera l'enjeu du chapitre 3 où l'influence des hautes intensités comparée à celle des intensités modérées sera évaluée à partir de tests fonctionnels, de l'aptitude aérobie et de marqueurs de plasticité cérébrale.

### Références

- Acarin L, González B, Hidalgo J, Castro AJ & Castellano B (1999). Primary cortical glial reaction versus secondary thalamic glial response in the excitotoxically injured young brain: astroglial response and metallothionein expression. *Neuroscience* **92**, 827–839.
- Adreani CM, Hill JM & Kaufman MP (1997). Responses of group III and IV muscle afferents to dynamic exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **82**, 1811–1817.
- Adreani CM & Kaufman MP (1998). Effect of arterial occlusion on responses of group III and IV afferents to dynamic exercise. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **84**, 1827–1833.
- Amann M (2011). Central and Peripheral Fatigue: Interaction during Cycling Exercise in Humans. *Med Sci Sports Exerc* **43**, 2039–2045.
- Amann M, Blain GM, Proctor LT, Sebranek JJ, Pegelow DF & Dempsey JA (2011). Implications of group III and IV muscle afferents for high-intensity endurance exercise performance in humans: Muscle afferents, peripheral fatigue and endurance exercise. *J Physiol* **589**, 5299–5309.
- Amann M, Hopkins WG & Marcora SM (2008). Similar Sensitivity of Time to Exhaustion and Time-Trial Time to Changes in Endurance: *Med Sci Sports Exerc* **40**, 574–578.
- Andersen CS, Andersen AB & Finger S (1991). Neurological correlates of unilateral and bilateral “strokes” of the middle cerebral artery in the rat. *Physiol Behav* **50**, 263–269.
- Andres KH, von Düring M & Schmidt RF (1985). Sensory innervation of the Achilles tendon by group III and IV afferent fibers. *Anat Embryol (Berl)* **172**, 145–156.
- Angélica-Almeida M, Casal D, Mafra M, Mascarenhas-Lemos L, Martins-Ferreira J, Ferraz-Oliveira M, Amarante J & Goyri-O’Neill J (2013). Brachial plexus morphology and vascular supply in the wistar rat. *Acta Med Port* **26**, 243–250.
- Bessou P & Laporte Y (1961). Étude des récepteurs musculaires innervés par les fibres afférentes du groupe III (fibres myelinisées fines) chez le chat. *Arch Ital Biol* **99**, 293–321.
- Bigland-Ritchie B, Furbush F & Woods JJ (1986). Fatigue of intermittent submaximal voluntary contractions: central and peripheral factors. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **61**, 421–429.
- Birdsong WT, Fierro L, Williams FG, Spelta V, Naves LA, Knowles M, Marsh-Haffner J, Adelman JP, Almers W, Elde RP & McCleskey EW (2010). Sensing Muscle Ischemia: Coincident Detection of Acid and ATP via Interplay of Two Ion Channels. *Neuron* **68**, 739–749.
- Block F, Dihné M & Loos M (2005). Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion. *Prog Neurobiol* **75**, 342–365.
- Boivie J (1971). The termination of the spinothalamic tract in the cat. An experimental study with silver impregnation methods. *Exp Brain Res* **112**, 331–353.
- Briggs F & Usrey WM (2008). Emerging views of corticothalamic function. *Curr Opin Neurobiol* **18**, 403–407.
- Brock LG, Eccles JC & Rall W (1951). Experimental investigations on the afferent fibres in muscle nerves. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **138**, 453–475.
- Carmichael ST (2005). Rodent models of focal stroke: Size, mechanism, and purpose. *NeuroRX* **2**, 396–409.
- Chang H-C, Yang Y-R, Wang PS, Kuo C-H & Wang R-Y (2010). Effects of insulin-like growth factor 1 on muscle atrophy and motor function in rats with brain ischemia. *Chin J Physiol* **53**, 337–348.
- Cho S-H & Lee J-H (2013). Comparison of the Amplitudes of the H-reflex of Post-stroke Hemiplegia Patients and Normal Adults during Walking. *J Phys Ther Sci* **25**, 729–732.
- Cox CL, Huguenard JR & Prince DA (1996). Heterogeneous axonal arborizations of rat thalamic reticular neurons in the ventrobasal nucleus. *J Comp Neurol* **366**, 416–430.
- Craig AD (1995). Distribution of brainstem projections from spinal lamina I neurons in the cat and the monkey. *J Comp Neurol* **361**, 225–248.
- Cramer SC, Nelles G, Benson RR, Kaplan JD, Parker RA, Kwong KK, Kennedy DN, Finklestein SP & Rosen BR (1997). A functional MRI study of subjects recovered from hemiparetic stroke. *Stroke* **28**, 2518–2527.
- Darques JL, Decherchi P & Jammes Y (1998). Mechanisms of fatigue-induced activation of group IV

- muscle afferents: the roles played by lactic acid and inflammatory mediators. *Neurosci Lett* **257**, 109–112.
- Decherchi P, Darques JL & Jammes Y (1998). Modifications of afferent activities from Tibialis anterior muscle in rat by tendon vibrations, increase of interstitial potassium or lactate concentration and electrically-induced fatigue. *J Peripher Nerv Syst JPNS* **3**, 267–276.
- Degtyarenko AM & Kaufman MP (2000). Stimulation of the mesencephalic locomotor region inhibits the discharge of neurons in the superficial laminae of the dorsal horn of cats. *Neurosci Lett* **296**, 109–112.
- Dihné M, Grommes C, Lutzenburg M, Witte OW & Block F (2002). Different mechanisms of secondary neuronal damage in thalamic nuclei after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **33**, 3006–3011.
- Dong WK, Ryu H & Wagman IH (1978). Nociceptive responses of neurons in medial thalamus and their relationship to spinothalamic pathways. *J Neurophysiol* **41**, 1592–1613.
- Dousset E, Marqueste T, Decherchi P, Jammes Y & Grelot L (2004). Effects of neonatal capsaicin deafferentation on neuromuscular adjustments, performance, and afferent activities from adult tibialis anterior muscle during exercise. *J Neurosci Res* **76**, 734–741.
- Duchateau J, Balestra C, Carpentier A & Hainaut K (2002). Reflex regulation during sustained and intermittent submaximal contractions in humans. *J Physiol* **541**, 959–967.
- Duchateau J & Hainaut K (1993). Behaviour of short and long latency reflexes in fatigued human muscles. *J Physiol* **471**, 787–799.
- von Düring M & Andres KH (1990). Topography and Ultrastructure of Group III and IV Nerve Terminals of the Cat's Gastrocnemius-Soleus Muscle. In *The Primary Afferent Neuron*, ed. Zenker W & Neuhuber WL, pp. 35–41. Springer US, Boston, MA. Available at: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-0579-8\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-0579-8_3) [Accessed December 1, 2016].
- Erlanger J & Gasser H (1924). The compound nature of the action current of nerve as disclosed by the cathode ray oscillograph. *Am J Physiol* **70**, 624–666.
- Erlanger J & Gasser H (1930). The action potential in fibers of slow conduction in spinal roots and somatic nerves. *Am J Physiol* **92**, 43–82.
- Foreman RD, Kenshalo DR, Schmidt RF & Willis WD (1979). Field potentials and excitation of primate spinothalamic neurones in response to volleys in muscle afferents. *J Physiol* **286**, 197–213.
- Freret T, Chazalviel L, Roussel S, Bernaudin M, Schumann-Bard P & Boulouard M (2006). Long-term functional outcome following transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation between brain damage and behavioral impairment. *Behav Neurosci* **120**, 1285–1298.
- 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.
- Gandevia SC (2001). Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev* **81**, 1725–1789.
- Garland SJ & McComas AJ (1990). Reflex inhibition of human soleus muscle during fatigue. *J Physiol* **429**, 17–27.
- Gasser HS (1950). Unmyelinated fibers originating in dorsal root ganglia. *J Gen Physiol* **33**, 651–690.
- Gregory NS & Sluka KA (2014). Anatomical and Physiological Factors Contributing to Chronic Muscle Pain. In *Behavioral Neurobiology of Chronic Pain*, ed. Taylor BK & Finn DP, pp. 327–348. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. Available at: [http://link.springer.com/10.1007/7854\\_2014\\_294](http://link.springer.com/10.1007/7854_2014_294) [Accessed December 1, 2016].
- Groenewegen HJ & Witter MP (2004). Thalamus. In *The Rat Nervous System*, pp. 407–453. Elsevier. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780125476386500183> [Accessed December 3, 2016].
- Guilbaud G, Oliveras JL, Giesler G & Besson JM (1977). Effects induced by stimulation of the central inferior nucleus of the raphe on dorsal horn interneurons in cat's spinal cord. *Brain Res* **126**, 355–360.
- Hanna RL (2003). Activation of thin-fiber muscle afferents by a P2X agonist in cats. *J Appl Physiol* **96**, 1166–1169.
- Hanna RL & Kaufman MP (2003). Role played by purinergic receptors on muscle afferents in evoking the exercise pressor reflex. *J Appl Physiol* **94**, 1437–1445.
- Haouzi P, Hill JM, Lewis BK & Kaufman MP (1999). Responses of group III and IV muscle afferents to distension of the peripheral vascular bed. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **87**, 545–553.
- Hayes SG (2006). Cyclooxygenase blockade attenuates responses of group III and IV muscle afferents to

- dynamic exercise in cats. *AJP Heart Circ Physiol* **290**, H2239–H2246.
- Hayes SG & Kaufman MP (2001). Gadolinium attenuates exercise pressor reflex in cats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**, H2153–H2161.
- Hayes SG, McCord JL, Koba S & Kaufman MP (2009). Gadolinium inhibits group III but not group IV muscle afferent responses to dynamic exercise: Gd<sup>3+</sup> and dynamic exercise. *J Physiol* **587**, 873–882.
- Hayward L, Wesselmann U & Rymer WZ (1991). Effects of muscle fatigue on mechanically sensitive afferents of slow conduction velocity in the cat triceps surae. *J Neurophysiol* **65**, 360–370.
- Hellon RF & Mitchell D (1975). Proceedings: Characteristics of neurones in the ventrobasal thalamus of the rat which respond to noxious stimulation of the tail. *J Physiol* **250**, 29P – 30P.
- Herr MD, Imadojemu V, Kunselman AR & Sinoway LI (1999). Characteristics of the muscle mechanoreflex during quadriceps contractions in humans. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985* **86**, 767–772.
- Hertel HC, Howaldt B & Mense S (1976). Responses of group IV and group III muscle afferents to thermal stimuli. *Brain Res* **113**, 201–205.
- Honda CN, Mense S & Perl ER (1983). Neurons in ventrobasal region of cat thalamus selectively responsive to noxious mechanical stimulation. *J Neurophysiol* **49**, 662–673.
- Hwang I-S, Lin C-F, Tung L-C & Wang C-H (2004). Responsiveness of the H reflex to loading and posture in patients following stroke. *J Electromyogr Kinesiol* **14**, 653–659.
- Iizuka H, Sakatani K & Young W (1990). Neural damage in the rat thalamus after cortical infarcts. *Stroke* **21**, 790–794.
- Iles JF & Pisini JV (1992). Cortical modulation of transmission in spinal reflex pathways of man. *J Physiol* **455**, 425–446.
- Justicia C, Ramos-Cabrer P & Hoehn M (2008). MRI detection of secondary damage after stroke: chronic iron accumulation in the thalamus of the rat brain. *Stroke* **39**, 1541–1547.
- Kalezic I, Bugaychenko LA, Kostyukov AI, Pilyavskii AI, Ljubisavljevic M, Windhorst U & Johansson H (2004a). Fatigue-related depression of the feline monosynaptic gastrocnemius-soleus reflex. *J Physiol* **556**, 283–296.
- Kalezic I, Pilyavskii A., Maisky V., Kostyukov A., Windhorst U & Johansson H (2004b). Distinctive pattern of c-fos expression in the feline cervico-lumbar spinal cord after stimulation of vanilloid receptors in dorsal neck muscles. *Neurosci Lett* **364**, 94–97.
- Kaufman MP, Longhurst JC, Rybicki KJ, Wallach JH & Mitchell JH (1983). Effects of static muscular contraction on impulse activity of groups III and IV afferents in cats. *J Appl Physiol* **55**, 105–112.
- Kaufman MP & Rybicki KJ (1987). Discharge properties of group III and IV muscle afferents: their responses to mechanical and metabolic stimuli. *Circ Res* **61**, I60–I65.
- Kaufman MP, Rybicki KJ, Waldrop TG & Ordway GA (1984a). Effect of ischemia on responses of group III and IV afferents to contraction. *J Appl Physiol* **57**, 644–650.
- Kaufman MP, Waldrop TG, Rybicki KJ, Ordway GA & Mitchell JH (1984b). Effects of static and rhythmic twitch contractions on the discharge of group III and IV muscle afferents. *Cardiovasc Res* **18**, 663–668.
- Kindig AE, Hayes SG & Kaufman MP (2007). Purinergic 2 receptor blockade prevents the responses of group IV afferents to post-contraction circulatory occlusion: PPADS and group IV afferents. *J Physiol* **578**, 301–308.
- Kniffki KD & Mizumura K (1983). Responses of neurons in VPL and VPL-VL region of the cat to algescic stimulation of muscle and tendon. *J Neurophysiol* **49**, 649–661.
- Kniffki KD, Schomburg ED & Steffens H (1979). Synaptic responses of lumbar alpha-motoneurons to chemical algescic stimulation of skeletal muscle in spinal cats. *Brain Res* **160**, 549–552.
- Kniffki KD, Schomburg ED & Steffens H (1981a). Synaptic effects from chemically activated fine muscle afferents upon alpha-motoneurons in decerebrate and spinal cats. *Brain Res* **206**, 361–370.
- Kniffki KD, Schomburg ED & Steffens H (1981b). Effects from fine muscle and cutaneous afferents on spinal locomotion in cats. *J Physiol* **319**, 543–554.
- Kobayashi K, Fukuoka T, Yamanaka H, Dai Y, Obata K, Tokunaga A & Noguchi K (2005). Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Comp Neurol* **481**, 377–390.

- Kruger L, Light AR & Schweizer FE (2003). Axonal terminals of sensory neurons and their morphological diversity. *J Neurocytol* **32**, 205–216.
- Kumazawa T & Mizumura K (1977). Thin-fibre receptors responding to mechanical, chemical, and thermal stimulation in the skeletal muscle of the dog. *J Physiol* **273**, 179–194.
- Lamy J-C, Iglesias C, Lackmy A, Nielsen JB, Katz R & Marchand-Pauvert V (2008). Modulation of recurrent inhibition from knee extensors to ankle motoneurons during human walking: Recurrent inhibition during walking. *J Physiol* **586**, 5931–5946.
- Laurin J, Dousset E & Decherchi P (2010). Modulation of the spinal excitability by muscle metabosensitive afferent fibers. *J Neurosci Res* n/a – n/a.
- Laurin J, Pertici V, Dousset E, Marqueste T & Decherchi P (2015). Group III and IV muscle afferents: Role on central motor drive and clinical implications. *Neuroscience* **290**, 543–551.
- Laurin J, Pin-Barre C, Bernard G, Dousset E & Decherchi P (2016). Functional and Neuromuscular Changes after Anterior Cruciate Ligament Rupture in Rats: *Med Sci Sports Exerc* **48**, 1033–1043.
- Liang JN & Brown DA (2015). Impaired H-Reflex Gain during Postural Loaded Locomotion in Individuals Post-Stroke ed. Lebedev MA. *PLOS ONE* **10**, e0144007.
- Light AR, Hughen RW, Zhang J, Rainier J, Liu Z & Lee J (2008). Dorsal Root Ganglion Neurons Innervating Skeletal Muscle Respond to Physiological Combinations of Protons, ATP, and Lactate Mediated by ASIC, P2X, and TRPV1. *J Neurophysiol* **100**, 1184–1201.
- Li J & Sinoway LI (2002). ATP stimulates chemically sensitive and sensitizes mechanically sensitive afferents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**, H2636–H2643.
- Lim RK, Guzman F, Rodgers DW, Goto K, Braun C, Dickerson GD & Engle RJ (1964). SITE OF ACTION OF NARCOTIC AND NON-NARCOTIC ANALGESICS DETERMINED BY BLOCKING BRADYKININ-EVOKED VISCERAL PAIN. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **152**, 25–58.
- Lloyd PC (1943). Neuron patterns controlling transmission of ipsilateral hind limb reflexes in cat. *J Neurophysiol*.
- Mallart A (1968). Thalamic projection of muscle nerve afferents in the cat. *J Physiol* **194**, 337–353.
- Mancini DM, Walter G, Reichek N, Lenkinski R, McCully KK, Mullen JL & Wilson JR (1992). Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation* **85**, 1364–1373.
- Martinov T, Mack M, Sykes A & Chatterjea D (2013). Measuring Changes in Tactile Sensitivity in the Hind Paw of Mice Using an Electronic von Frey Apparatus. *J Vis Exp*; DOI: 10.3791/51212.
- Martin PG, Smith JL, Butler JE, Gandevia SC & Taylor JL (2006). Fatigue-sensitive afferents inhibit extensor but not flexor motoneurons in humans. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **26**, 4796–4802.
- Matsuura W, Harada S & Tokuyama S (2016a). Effects of Adjuvant Analgesics on Cerebral Ischemia-Induced Mechanical Allodynia. *Biol Pharm Bull* **39**, 856–862.
- Matsuura W, Kageyama E, Harada S & Tokuyama S (2016b). Unique action mechanisms of tramadol in global cerebral ischemia-induced mechanical allodynia: *NeuroReport* **27**, 699–704.
- McCloskey DI & Mitchell JH (1972). Reflex cardiovascular and respiratory responses originating in exercising muscle. *J Physiol* **224**, 173–186.
- Mense S (1977). Muscular nociceptors. *J Physiol (Paris)* **73**, 233–240.
- Mense S (1981). Sensitization of group IV muscle receptors to bradykinin by 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2. *Brain Res* **225**, 95–105.
- Mense S (1986). Slowly Conducting Afferent Fibers from Deep Tissues: Neurobiological Properties and Central Nervous Actions. In *Progress in Sensory Physiology 6*, ed. Autrum H, Ottoson D, Perl ER, Schmidt RF, Shimazu H & Willis WD, pp. 139–219. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. Available at: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-70411-6\\_4](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-70411-6_4) [Accessed December 1, 2016].
- Mense S (1996). Group III and IV receptors in skeletal muscle: are they specific or polymodal? *Prog Brain Res* **113**, 83–100.
- Mense S (2009). Algesic agents exciting muscle nociceptors. *Exp Brain Res* **196**, 89–100.
- Mense S & Meyer H (1985). Different types of slowly conducting afferent units in cat skeletal muscle and tendon. *J Physiol* **363**, 403–417.
- Mense S & Meyer H (1988). Bradykinin-induced modulation of the response behaviour of different

- types of feline group III and IV muscle receptors. *J Physiol* **398**, 49–63.
- Mense S & Skeppar P (1991). Discharge behaviour of feline gamma-motoneurons following induction of an artificial myositis. *Pain* **46**, 201–210.
- Mense S & Stahnke M (1983). Responses in muscle afferent fibres of slow conduction velocity to contractions and ischaemia in the cat. *J Physiol* **342**, 383–397.
- Middlekauff HR (2004). Muscle mechanoreceptor sensitivity in heart failure. *AJP Heart Circ Physiol* **287**, H1937–H1943.
- Mitchell JH, Kaufman MP & Iwamoto GA (1983). The exercise pressor reflex: its cardiovascular effects, afferent mechanisms, and central pathways. *Annu Rev Physiol* **45**, 229–242.
- Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P & Hodges H (2000). Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods* **104**, 99–109.
- Molliver DC, Immke DC, Fierro L, Paré M, Rice FL & McCleskey EW (2005). ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons. *Mol Pain* **1**, 35.
- Murphy TH & Corbett D (2009). Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* **10**, 861–872.
- Osteen JD et al. (2016). Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain. *Nature* **534**, 494–499.
- Paintal AS (1967). A comparison of the nerve impulses of mammalian non-medullated nerve fibres with those of the smallest diameter medullated fibres. *J Physiol* **193**, 523–533.
- Paxinos G & Watson C (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic, Amsterdam; Boston; Oxford. Available at: <http://site.ebrary.com/id/10378802> [Accessed December 2, 2016].
- Pettorossi VE, Torre GD, Bortolami R & Brunetti O (1999). The role of capsaicin-sensitive muscle afferents in fatigue-induced modulation of the monosynaptic reflex in the rat. *J Physiol* **515**, 599–607.
- Pin-Barre C, Laurin J, Felix M-S, Pertici V, Kober F, Marqueste T, Matarazzo V, Muscatelli-Bossy F, Temprado J-J, Brisswalter J & Decherchi P (2014). Acute Neuromuscular Adaptation at the Spinal Level Following Middle Cerebral Artery Occlusion-Reperfusion in the Rat ed. Annunziato L. *PLoS ONE* **9**, e89953.
- Pomeranz B, Wall PD & Weber WV (1968). Cord cells responding to fine myelinated afferents from viscera, muscle and skin. *J Physiol* **199**, 511–532.
- Popp A, Jaenisch N, Witte OW & Frahm C (2009). Identification of Ischemic Regions in a Rat Model of Stroke ed. Kleinschnitz C. *PLoS ONE* **4**, e4764.
- Reinert A, Kaske A & Mense S (1998). Inflammation-induced increase in the density of neuropeptide-immunoreactive nerve endings in rat skeletal muscle. *Exp Brain Res* **121**, 174–180.
- Ross DT & Ebner FF (1990). Thalamic retrograde degeneration following cortical injury: an excitotoxic process? *Neuroscience* **35**, 525–550.
- Rotto DM, Hill JM, Schultz HD & Kaufman MP (1990a). Cyclooxygenase blockade attenuates responses of group IV muscle afferents to static contraction. *Am J Physiol* **259**, H745–H750.
- Rotto DM & Kaufman MP (1988). Effect of metabolic products of muscular contraction on discharge of group III and IV afferents. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **64**, 2306–2313.
- Rotto DM, Schultz HD, Longhurst JC & Kaufman MP (1990b). Sensitization of group III muscle afferents to static contraction by arachidonic acid. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **68**, 861–867.
- Rybicki KJ & Kaufman MP (1985). Stimulation of group III and IV muscle afferents reflexly decreases total pulmonary resistance in dogs. *Respir Physiol* **59**, 185–195.
- Rybicki KJ, Waldrop TG & Kaufman MP (1985). Increasing gracilis muscle interstitial potassium concentrations stimulate group III and IV afferents. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **58**, 936–941.
- Schallert T (2006). Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx J Am Soc Exp Neurother* **3**, 497–504.
- Schallert T, Upchurch M, Lobaugh N, Farrar SB, Spirduso WW, Gilliam P, Vaughn D & Wilcox RE (1982). Tactile extinction: distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacol Biochem Behav* **16**, 455–462.
- Schomburg ED & Steffens H (2002). Only minor spinal motor reflex effects from feline group IV muscle nociceptors. *Neurosci Res* **44**, 213–223.

- Schomburg ED, Steffens H & Kniffki K-D (1999). Contribution of group III and IV muscle afferents to multisensorial spinal motor control in cats. *Neurosci Res* **33**, 195–206.
- Sicard KM & Fisher M (2009). Animal models of focal brain ischemia. *Exp Transl Stroke Med* **1**, 7.
- Sinoway LI, Hill JM, Pickar JG & Kaufman MP (1993). Effects of contraction and lactic acid on the discharge of group III muscle afferents in cats. *J Neurophysiol* **69**, 1053–1059.
- Soriano MA, Ferrer I, Rodríguez-Farré E & Planas AM (1996). Apoptosis and c-Jun in the thalamus of the rat following cortical infarction. *Neuroreport* **7**, 425–428.
- Stacey MJ (1969). Free nerve endings in skeletal muscle of the cat. *J Anat* **105**, 231–254.
- Tamura A, Kirino T, Sano K, Takagi K & Oka H (1990). Atrophy of the ipsilateral substantia nigra following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res* **510**, 154–157.
- Taylor JL, Butler JE & Gandevia SC (2000). Changes in muscle afferents, motoneurons and motor drive during muscle fatigue. *Eur J Appl Physiol* **83**, 106–115.
- Thimm F & Baum K (1987). Response of chemosensitive nerve fibers of group III and IV to metabolic changes in rat muscles. *Pflugers Arch* **410**, 143–152.
- Tosolini AP & Morris R (2012). Spatial characterization of the motor neuron columns supplying the rat forelimb. *Neuroscience* **200**, 19–30.
- Uluç K, Miranpuri A, Kujoth GC, Aktüre E & Başkaya MK (2011). Focal Cerebral Ischemia Model by Endovascular Suture Occlusion of the Middle Cerebral Artery in the Rat. *J Vis Exp*; DOI: 10.3791/1978.
- Wang H-J, Li Y-L, Gao L, Zucker IH & Wang W (2010a). Alteration in skeletal muscle afferents in rats with chronic heart failure: Group III and IV afferents in chronic heart failure. *J Physiol* **588**, 5033–5047.
- Wang H-J, Li Y-L, Zucker IH & Wang W (2012a). Exercise training prevents skeletal muscle afferent sensitization in rats with chronic heart failure. *AJP Regul Integr Comp Physiol* **302**, R1260–R1270.
- Wang HJ, Pan YX, Wang WZ, Gao L, Zimmerman MC, Zucker IH & Wang W (2010b). Exercise training prevents the exaggerated exercise pressor reflex in rats with chronic heart failure. *J Appl Physiol* **108**, 1365–1375.
- Wang J, Song H, Tang X, Yang Y, Vieira VJ, Niu Y & Ma Y (2012b). Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scand J Med Sci Sports* **22**, 643–652.
- Watanabe H, Kumon Y, Ohta S, Sakaki S, Matsuda S & Sakanaka M (1998). Changes in protein synthesis and calcium homeostasis in the thalamus of spontaneously hypertensive rats with focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* **18**, 686–696.
- Watanabe H, Ohta S, Kumon Y, Sakaki S & Sakanaka M (1999). Increase in p53 protein expression following cortical infarction in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res* **837**, 38–45.
- Wei L, Ying D-J, Cui L, Langsdorf J & Ping Yu S (2004). Necrosis, apoptosis and hybrid death in the cortex and thalamus after barrel cortex ischemia in rats. *Brain Res* **1022**, 54–61.
- Windhorst U, Meyer-Lohmann J, Kirmayer D & Zochodne D (1997). Renshaw cell responses to intra-arterial injection of muscle metabolites into cat calf muscles. *Neurosci Res* **27**, 235–247.
- Yang F, Fu H, Lu Y-F, Wang X-L, Yang Y, Yang F, Yu Y-Q, Sun W, Wang J-S, Costigan M & Chen J (2014). Post-stroke pain hypersensitivity induced by experimental thalamic hemorrhage in rats is region-specific and demonstrates limited efficacy of gabapentin. *Neurosci Bull* **30**, 887–902.
- Yang XC & Sachs F (1989). Block of stretch-activated ion channels in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. *Science* **243**, 1068–1071.
- Zhang J, Zhang Y, Xing S, Liang Z & Zeng J (2012). Secondary Neurodegeneration in Remote Regions After Focal Cerebral Infarction: A New Target for Stroke Management? *Stroke* **43**, 1700–1705.

# Chapitre III

## **Entraînement en endurance après une ischémie cérébrale chez le rat :**

### **Influence de l'intensité de l'exercice prolongé sur la neuroplasticité et la récupération fonctionnelle**

#### **Sommaire**

---

- 1. Influence de l'ischémie cérébrale sur l'activité microgliale, les facteurs neurotrophiques et l'activité GABAergique**
  - 2. Influence de l'entraînement en endurance sur la récupération fonctionnelle et la neuroplasticité après une ischémie cérébrale**
  - 3. Le rôle potentiel de l'intensité d'exercice dans la rééducation post-AVC**
  - 4. Considérations méthodologiques des programmes d'endurance**
  - 5. Étude n°3 : Comparaison des effets d'un entraînement de type fractionné de haute intensité avec un entraînement prolongé continu sur la neuroplasticité et la récupération fonctionnelle chez le rat**
-



Ce chapitre envisage le rôle primordial de l'activité physique<sup>1</sup> de type endurance comme stratégie thérapeutique pour le patient AVC aussi bien au niveau fonctionnel qu'au niveau des adaptations cérébrales. Les activités d'endurance sont basées sur la qualité d'endurance qui permet de soutenir une vitesse donnée le plus longtemps possible (ou de soutenir la plus haute puissance moyenne ou constante possible) (Bocquet & Billat, 1999). La voie métabolique principale des exercices d'endurance est la voie aérobie (phosphorylation oxydative à l'intérieur des mitochondries) (Rowe *et al.*, 2014). L'entraînement en endurance entraîne des adaptations des systèmes cardiorespiratoires et neuromusculaires qui permettent d'augmenter l'aptitude aérobie à travers ses paramètres caractéristiques qui sont la consommation maximale d'oxygène ( $VO_{2max}$ ), la fraction maximale pouvant être soutenue ( $F.VO_{2max}$ ) et les paramètres de la cinétique de  $VO_2$  qui caractérisent le coût énergétique de la locomotion (Jones & Burnley, 2009). Ce type d'entraînement semble pertinent pour les patients qui montrent une baisse importante de leur aptitude aérobie comme mentionné dans le chapitre I.

Les études sur le modèle animal permettent d'étudier les adaptations cérébrales à l'échelle cellulaire et moléculaire à la suite de l'entraînement en endurance. Il a été montré que l'exercice d'endurance modifie l'activité cérébrale dans presque toutes les zones cérébrales du sujet sain et vieillissant, ce qui pourrait potentiellement optimiser la récupération des différentes fonctions perdues (motrices et/ou cognitives) suite à l'ischémie cérébrale (van Praag *et al.*, 2014; Pin-Barre & Laurin, 2015; Constans *et al.*, 2016). L'exercice d'endurance est en effet capable de générer des effets neuroprotecteurs endogènes liés à plusieurs mécanismes interdépendants qui perdurent dans le temps (Jensen & Yong, 2014; van Praag *et al.*, 2014; Pin-Barre & Laurin, 2015). Ces mécanismes incluent l'activation de la microglie, élément majeur de la neuroinflammation influençant l'évolution

---

<sup>1</sup> Tout mouvement corporel produit par les muscles squelettiques associé à une dépense énergétique significative (Billinger *et al.*, 2014).

de la plasticité cérébrale, et l'augmentation du niveau des facteurs neurotrophiques<sup>1</sup> (Cobianchi *et al.*, 2016). Ces facteurs neurotrophiques peuvent avoir des répercussions sur l'activité synaptique, incluant l'activité GABAergique qui est modulée après des traumatismes du SNC et notamment par l'ischémie cérébrale (Ben-Ari, 2002; Payne *et al.*, 2003; Jaenisch *et al.*, 2010). L'activité GABAergique sera analysée à partir de l'expression des co-transporteurs du chlore (Cl<sup>-</sup>) responsables de l'homéostasie du Cl<sup>-</sup>, connue pour réguler l'équilibre entre excitation et inhibition neuronale, et donc l'excitabilité neuronale (Blaesse *et al.*, 2009; Ben-Ari *et al.*, 2012). L'influence de l'activité physique sur ces mécanismes n'a pas été abordée à ce jour. Cependant, les exercices d'endurance proposés à ce jour restent à justifier et à optimiser. L'intensité d'exercice est un paramètre majeur pour déterminer l'efficacité d'une stratégie d'entraînement mais qui reste controversé. L'objet de ce chapitre est d'identifier les caractéristiques d'une stratégie d'entraînement en endurance la plus efficace et ses répercussions sur la plasticité cérébrale et la récupération fonctionnelle.

Dans un premier temps, nous ciblerons les mécanismes de neuroplasticité interdépendants énoncés ci-dessus pouvant influencer la récupération fonctionnelle, puis nous dégagerons les hypothèses qui permettent d'envisager l'intérêt de l'entraînement en endurance sur ces mécanismes cérébraux et fonctionnels à la suite d'une ischémie cérébrale chez le rat.

---

<sup>1</sup> Représentent une famille de protéines impliquées dans la croissance, la survie et la différenciation des neurones. Ils contrôlent le développement du système nerveux et sont également essentiels au maintien des fonctions cérébrales nerveuses ainsi qu'aux phénomènes de plasticité adaptative qui, bien qu'atténués, persistent chez l'adulte.

## 1. Influence de l'ischémie cérébrale sur l'activité microgliale, les facteurs neurotrophiques et l'activité GABAergique

### 1.1 Le rôle de la microglie dans l'inflammation et la neuroplasticité post-ischémique

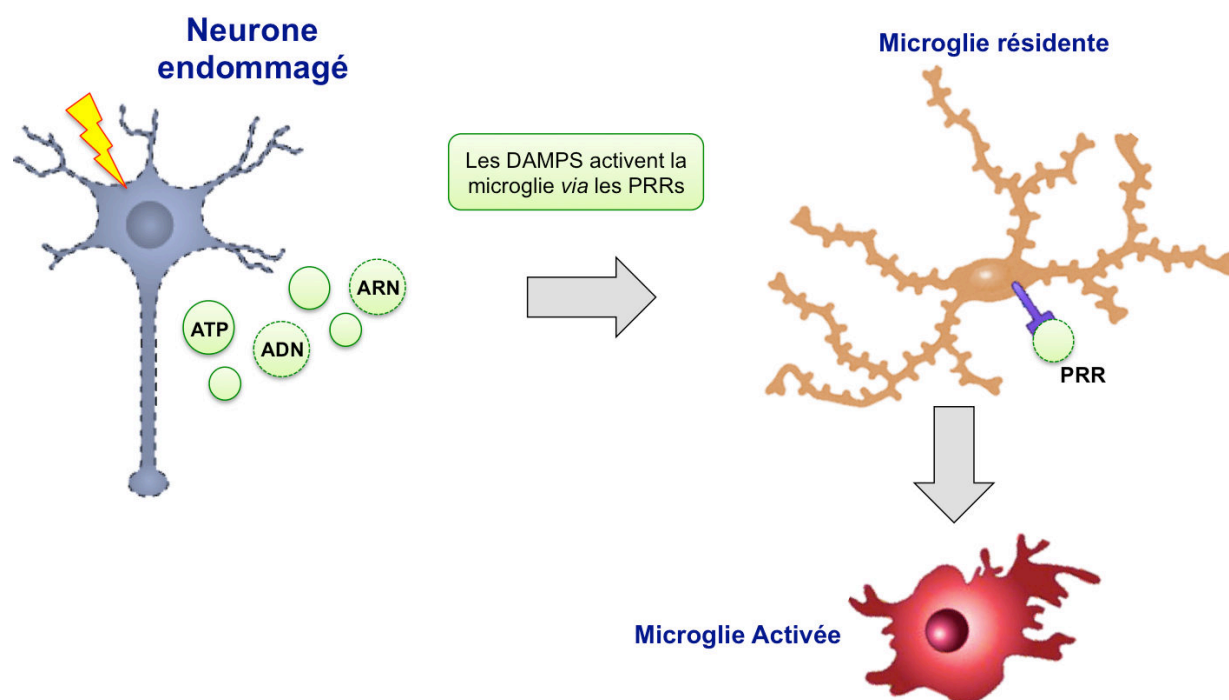
La neuroinflammation post-ischémique est un processus qui peut induire d'une part des dommages neuronaux et d'autre part favoriser la plasticité cérébrale bénéfique (*cf. Chapitre I, section 2.5 - p.25*). Dans ce cadre, les cellules microgliales peuvent exercer ces 2 fonctions opposées soit en réparant les tissus lésés et en stimulant la plasticité synaptique nécessaire à la récupération fonctionnelle, soit en induisant une action neurotoxique délétère pour les tissus nerveux ([Kriz & Lalancette-Hébert, 2009](#)).

Les cellules microgliales<sup>1</sup> sont parmi les premières cellules à réagir suite à une ischémie cérébrale contribuant majoritairement à la réaction inflammatoire ([Madinier et al., 2009](#)). L'activation microgliale débute dans les premières minutes-heures ( $\approx 30$  min) après une ischémie avec un pic mesuré à 2-3 jours ou à 5-7 jours post-ischémie (selon les études) et peut perdurer plusieurs semaines ([Gelderblom et al., 2009](#); [Kim et al., 2016](#)). Cette réponse précoce peut s'expliquer par le fait que les cellules mourantes libèrent les DAMPS<sup>2</sup> (*Damage-associated molecular patterns*) connus pour se fixer sur des récepteurs spécifiques localisés sur les cellules microgliales (mais aussi sur les neurones et astrocytes), les PRRs (*pattern recognition receptors*) ([Rock et al., 2010](#); [Fumagalli et al., 2015](#)). Une fois rattachés à ces récepteurs, les cellules microgliales sont alors activées (**Figure 3.1**).

---

<sup>1</sup> La microglie représente les macrophages résidents du SNC. C'est une sous-catégorie de cellule gliale (5 à 20 %) exerçant plusieurs fonctions, bénéfiques comme délétères, suite à un traumatisme du SNC ([Lawson et al., 1992](#)).

<sup>2</sup> Les DAMPs incluent les protéines cytoplasmiques, l'ARN, l'ADN, l'ATP, les composants de matrice extracellulaire libérés par les cellules mourantes déclenchant l'inflammation.

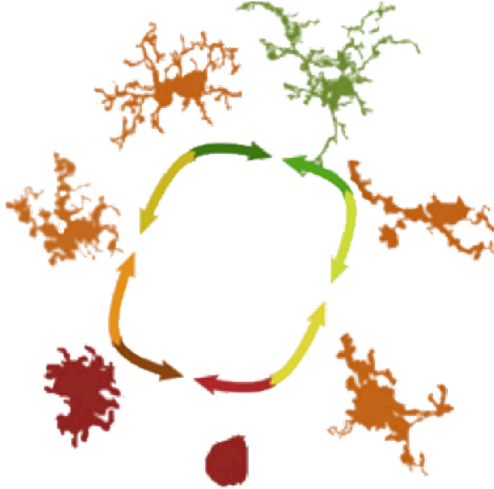


**Figure 3.1** : Illustration des effets des DAMPS sur l'activation de la microglie résidente après un AVC. PRR: pattern-recognition receptors ; DAMPS : Damage-associated molecular patterns.

Les cellules microgliales montrent un haut niveau de plasticité puisqu'elles peuvent changer de forme en réponse à un événement induisant dans le même temps une modification de leur fonction (**Figure 3.2**) (Beynon & Walker, 2012). Dans le tissu nerveux sain, la microglie dite « résidente » est sous forme ramifiée (ramifications longues et fines) et contrôle l'activité neuronale et le nombre de synapses (Kim *et al.*, 2016). Une fois activée, la microglie passe d'une configuration « résidente » à une configuration « réactive » (ou « activée »). La configuration réactive peut être soit sous forme ramifiée, dont les ramifications sont plus courtes et plus larges que la forme résidente, soit sous forme amiboïde (ronde et sans ramifications, voire avec une seule ramification pour faciliter leur mobilité).

### Résidente ramifiée/Non-activée

Allant d'un petit soma rond à ovale; noyau relativement grand avec un petit cytoplasme péri-nucléaire; branches assez fines par rapport au corps cellulaire; en culture, les processus présentent des terminaisons étendues très fines et difficiles à détecter; processus ondulés; marquages faibles.



### Intermédiaires (ramifiées, se ramifiant ou se dé-ramifiant)

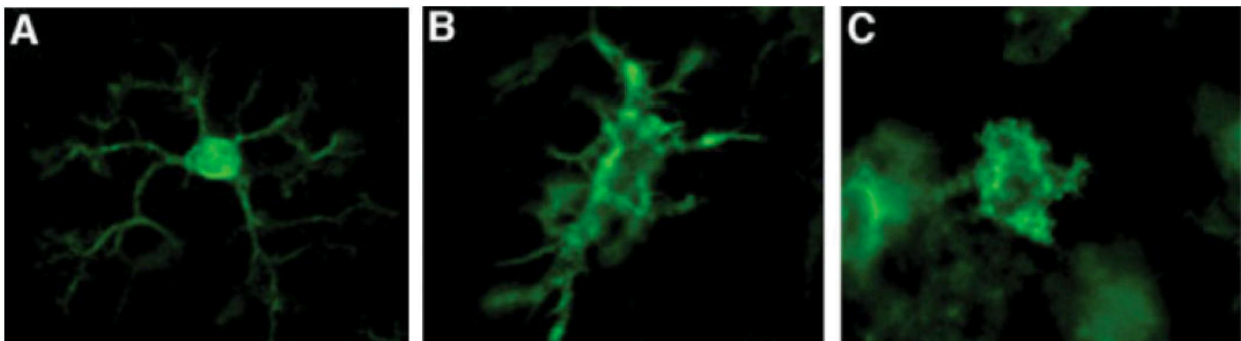
Processus robustes étendus à l'intérieur et à l'extérieur; marquage généralement plus important que celui des cellules ramifiées; processus hypertrophiés et « hirsutes ».

**Hypertrophiés:** soma large et allongé avec processus épais et rétractés,

**Hirsutes:** nombreux processus, épais et courts avec différents diamètres, agencés dans de larges faisceaux autour d'un soma gonflé mais distinguable de la microglie hypertrophiée grâce à une réduction importante de l'envergure totale de leurs processus.

### Microglie non-ramifiée réactive/Amiboïde

Corps cellulaires ronds très larges en forme de « gouttes »; processus peu nombreux et souvent très courts.



**Figure 3.2 : Les différentes formes de la microglie.** Le schéma du haut indique qu'il existe de nombreuses morphologies de la microglie. La 2<sup>ème</sup> image regroupe les différentes formes de la microglie classiquement observées en imagerie. Microglie: (A) résidente de forme ramifiée, (B) réactive ramifiée (intermédiaire) et (C) forme amiboïde [adaptée de (Karperien *et al.*, 2013)].

La microglie de forme amiboïde exerce une action pro-inflammatoire et une fonction phagocytaire. La microglie amiboïde dans la zone péri-ischémique peut être délétère pour la neurogenèse (Xiong *et al.*, 2016). En revanche, la microglie réactive ramifiée peut exercer soit une action pro-inflammatoire soit une action anti-inflammatoire (phénotypes M1 et M2 respectivement)<sup>1</sup>. Cette polarisation de la microglie dépend de la sévérité de la lésion, des

<sup>1</sup> La microglie activée de type M1 présente une action pro-inflammatoire ce qui est considéré comme un rôle délétère. A l'opposé, la microglie activée de type M2 présente une action anti-inflammatoire pour diminuer l'inflammation et favoriser la réparation des tissus.

cytokines<sup>1</sup> auxquelles elle est exposée [M1 : *Interferon-γ* (IFN-γ), *interleukin-1β* (IL-1β) et TNF-α ; M2 : les interleukines IL-4, IL-10, IL-13 et le *transforming growth factor-β* (TGF-β)] et/ou de la période post-ischémique (**Figure 3.3 et 3.4**) (Hu *et al.*, 2014).

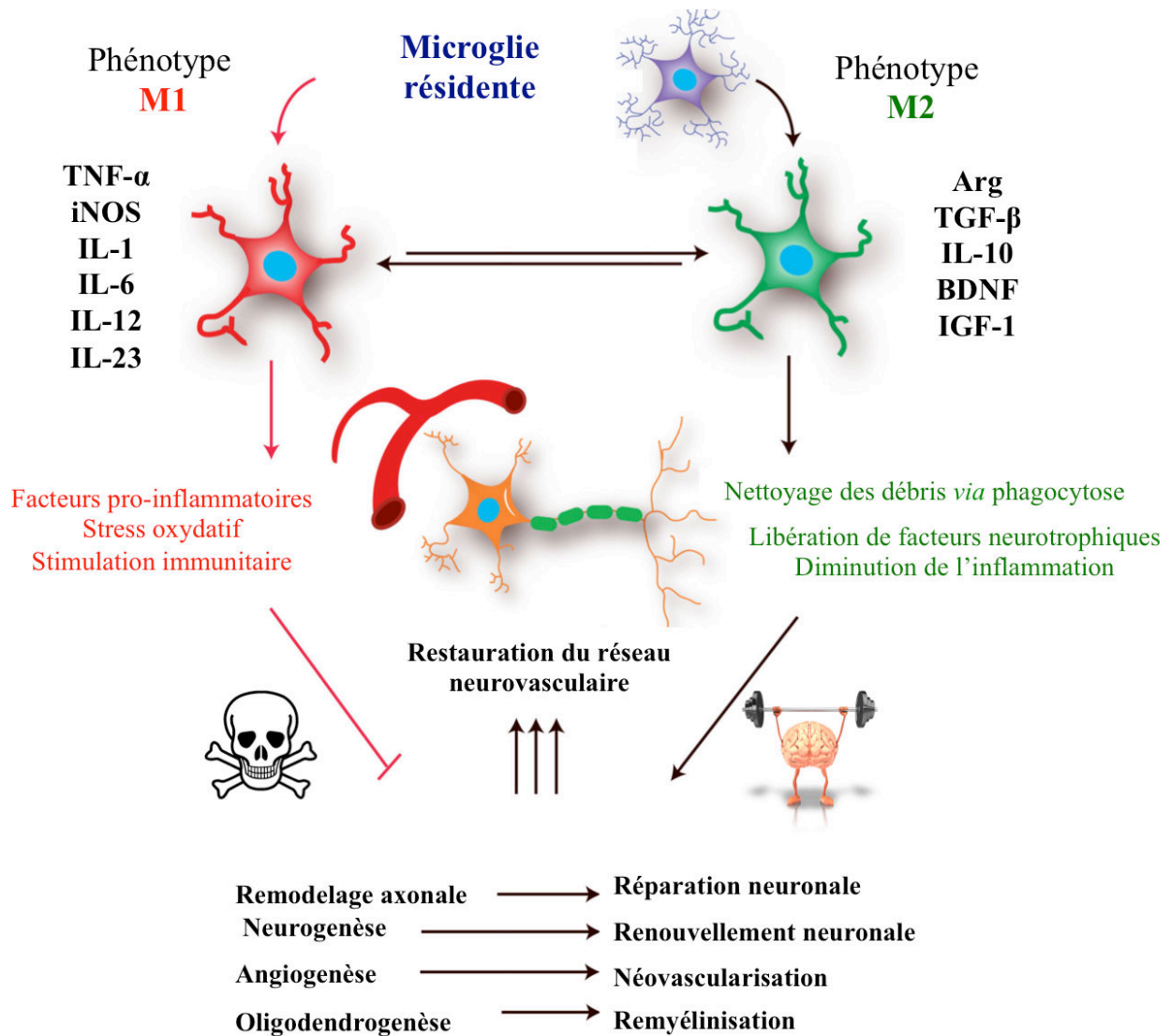
Le sous-type M1 sécrète des substances toxiques pour les cellules environnantes telles que des cytokines pro-inflammatoires, des ROS et du NO (**Figure 3.3**). L'IFN-γ, l'IL-1β, le TNF-α, l'IL-6 et l'IL-12 sont les cytokines pro-inflammatoires les plus caractéristiques. La microglie de type M1 présente aussi une surexpression de différents *toll-like receptors* (TLR), les TLR2 et TLR4 (récepteurs faisant partis des PRRs), qui ont également une activité pro-inflammatoire importante<sup>2</sup> (Fumagalli *et al.*, 2015). En effet, une fois activés par leurs ligands, les TLR jouent un rôle dans la polarisation de la microglie en phénotype M1. Le type M1 produit également des enzymes protéolytiques comme le MMP-9 et le MMP-3 qui altèrent la BHE (Svensson *et al.*, 2015).

A l'opposé, le sous-type M2 contribue à la diminution de l'inflammation en libérant des cytokines anti-inflammatoires (*e.g.* IL-10) qui vont réparer les tissus lésés (Cherry *et al.*, 2014). La microglie de phénotype M2 présente également la capacité de sécréter des facteurs neurotrophiques, comme le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), le *glial cell-derived neurotrophic factor* (GDNF), l'*insulin-like growth factor-1* (IGF-1), la neurotrophine 3 (NT-3), le *nerve growth factor* (NGF) et le TGF-β, générant un effet neuroprotecteur (Miwa *et al.*, 1997; Hailer, 2008; Loane & Byrnes, 2010; Svensson *et al.*, 2015). Le phénotype M2 produit également des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) et l'IL-8 et régule les EPCs (*Endothéliale Progenitor Cells*). Ces cellules sont donc également impliquées dans la réparation de la BHE et l'angiogenèse (Hu *et al.*, 2014).

---

<sup>1</sup> Les cytokines représentent une famille de glycoprotéines impliquée dans la communication entre les cellules lors d'une réponse inflammatoire. Elles jouent donc un rôle de médiateurs favorisant le mouvement des cellules vers le site lésionnel.

<sup>2</sup> En activant la voie du facteur de transcription Nuclear factor-kappa B (NF-κB) qui est impliquée dans la diminution des performances fonctionnelles.



**Figure 3.3 :** Les différentes fonctions établies de la microglie selon le phénotype M1 et M2 (i.e. pro-inflammatoire et anti-inflammatoire respectivement). Arg : Arginase (Adaptée de Hu et al 2014).

L'activité microgliale évolue au cours du temps suite à une ischémie cérébrale (**Figure 3.4**). L'expression de la protéine *ionized calcium binding adaptor molecule 1* (Iba-1) reflète une activation maximale de la microglie à la fin de la première semaine suivant l'ischémie cérébrale et qui reste importante à 14 jours (Ito et al., 2001). Plus précisément, dans les 2 premiers jours environ, la microglie réactive semble jouer un rôle bénéfique pour la réparation des tissus (phénotype M2 mais présence également de M1). Ensuite, la microglie bascule du phénotype M2 à M1 en quelques jours (de 2 à 7 jours) en fonction de la sévérité de la lésion. Au niveau de la zone entourant le cœur ischémique, la microglie est présente en abondance

surtout sous sa forme réactive alors qu'au niveau du cœur, celle-ci est plutôt amiboïde (Ito *et al.*, 2001). Précisons que le phénotype M1 est prédominant sur le long terme (Cherry *et al.*, 2014). Les cellules microgliales présentent alors essentiellement des propriétés cytotoxiques en libérant des ROS, du NO et des cytokines pro-inflammatoires amplifiant les dommages cérébraux. De plus, la forme amiboïde est davantage présente (Patel *et al.*, 2002). Par ailleurs, le phénotype M1 est délétère chez les animaux ayant subi une ischémie cérébrale car il a été montré que les souris présentent des conséquences plus délétères lorsque le phénotype M2 est bloqué (Cherry *et al.*, 2014). Une autre étude indique qu'en administrant un traitement anti-inflammatoire à la minocycline ou à l'indométhacine pendant plusieurs semaines l'expression des marqueurs microgliales associés au phénotype M1 est diminuée. Ce résultat est associé à une amélioration de la neurogenèse et des fonctions neurologiques (Hoehn *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2013). Il semble donc que les divers traitements doivent favoriser la conversion M1 à M2 pour optimiser la récupération fonctionnelle.



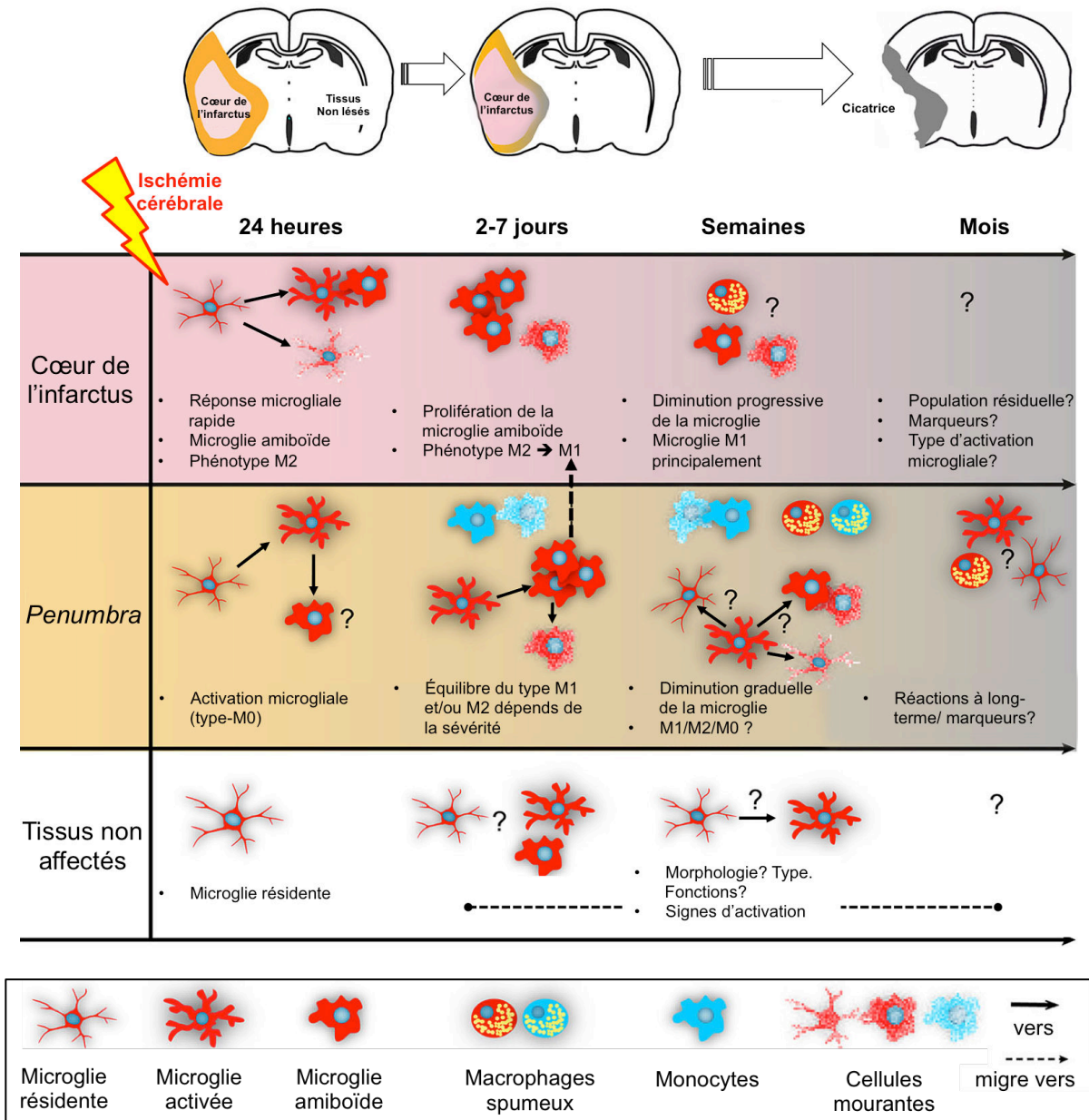


Figure 3.4 : Évolution du rôle de la microglie après l'ischémie cérébrale [Adaptée de (Lourbopoulos et al., 2015)].

Ainsi, en se basant sur les différentes morphologies et l'intensité de la réponse, l'activité microgliale constitue un indicateur sensible et fiable de dommage neuronal faisant d'elle un marqueur pertinent pour étudier la sévérité de l'ischémie cérébrale, l'évolution de la neuroplasticité post-traumatique et donc l'effet d'un traitement (Ito et al., 2001; Ma et al., 2016).

## *1.2 Le rôle des facteurs neurotrophiques dans la neuroplasticité post-ischémie cérébrale*

La libération de facteurs neurotrophiques est stimulée par l'ischémie cérébrale et joue un rôle majeur dans la protection et la régénération des tissus lésés (Abe, 2000; Ma *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2014). Ces changements sont fréquemment associés à l'amélioration de la récupération fonctionnelle.

### **1.2.1 Les neurotrophines et leurs récepteurs**

Lors d'une ischémie cérébrale, la survie des neurones endommagés est hautement dépendante de l'action des neurotrophines<sup>1</sup>. Les neurotrophines et leur récepteurs sont davantage sécrétés par des cellules cibles à savoir majoritairement les neurones, la microglie comme nous l'avons vu précédemment (et dans une moindre mesure, les astrocytes) et les cellules endothéliales (Berretta *et al.*, 2014). La fonction des neurotrophines telles que le BDNF, le NGF, le NT-3 et la neurotrophine 4 (NT-4) est déterminée par leur affinité avec leurs divers récepteurs spécifiques et aspécifiques : les tyrosines kinases (TrkA, B ou C), le *p75 neurotrophin receptor* (p75<sup>NTR</sup>), les *sortilin*, *Nogo*, *Lingo-1 receptors* (Abe, 2000; Lu *et al.*, 2005).

L'expression de p75<sup>NTR</sup> est augmentée dans les cellules nerveuses en réponse à une ischémie cérébrale (Kokaia *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 2000; Andsberg *et al.*, 2001; Angelo *et al.*, 2009; Irmady *et al.*, 2014). Le p75<sup>NTR</sup> a longtemps été détrôné par les récepteurs Trk alors qu'il est considéré aujourd'hui comme un médiateur essentiel des neurotrophines et l'un des acteurs majeurs de la neuroplasticité post-ischémique (Dechant & Barde, 2002; Meeker & Williams, 2015). Cependant, les rôles de p75<sup>NTR</sup> sont divers et peuvent être opposés car ce récepteur est à l'origine de plusieurs voies de signalisation pouvant soit favoriser la survie

---

<sup>1</sup> Les neurotrophines représentent une famille de facteurs neurotrophiques se distinguant par leur capacité à se fixer sur les récepteurs Trk et p75<sup>NTR</sup> et leur voies de signalisations activées.

neuronale et la repousse axonale soit activer les mécanismes de l'apoptose et de mort neuronale ainsi qu'inhiber la repousse axonale (Lu *et al.*, 2005; Meeker & Williams, 2015). Le rôle bénéfique ou délétère de ce récepteur dépend de son interaction avec les autres récepteurs à neurotrophines (TrkA, TrkB et TrkC) ou ceux qui sont non-neurotrophiques (*Sortilin, Nogo, Lingo-1*). Il agit donc surtout en tant que corécepteur potentialisant l'effet des autres récepteurs. Son association avec les récepteurs Trk supporte la survie cellulaire et la repousse axonale alors que son interaction avec les récepteurs non-neurotrophiques est associé à des effets délétères (Meeker & Williams, 2015). Pour appuyer ce propos, il a été montré sur des embryons de souris déficients en  $p75^{\text{NTR}}$  que les neurones sensoriels nécessitent 4 fois plus de NGF<sup>1</sup> que ces mêmes neurones issus d'embryons sauvages pour assurer le développement neuronal (Muller & Clos, 1997). L'étude de l'activité des récepteurs comme marqueur de plasticité cérébrale semble donc tout aussi importante que le niveau de l'expression de la neurotrophine en elle-même.

Son rôle dépend également de son affinité avec le précurseur protéique (*pro-*) des neurotrophines ou de leur forme mature (*m-*)<sup>2</sup>. Par exemple, l'association proBDNF/ $p75^{\text{NTR}}$  active les voies apoptotiques alors que le mBDNF/ $p75^{\text{NTR}}$  active les voies de survie cellulaire (Lu *et al.*, 2005). Le clivage de proBDNF en mBDNF est essentiel pour favoriser la plasticité cérébrale car le mBDNF se lie préférentiellement au récepteur TrkB pour pouvoir favoriser la synaptogenèse et la survie neuronale et son action sur  $p75^{\text{NTR}}$  devient favorable (Pang *et al.*, 2004; Shulga *et al.*, 2012).

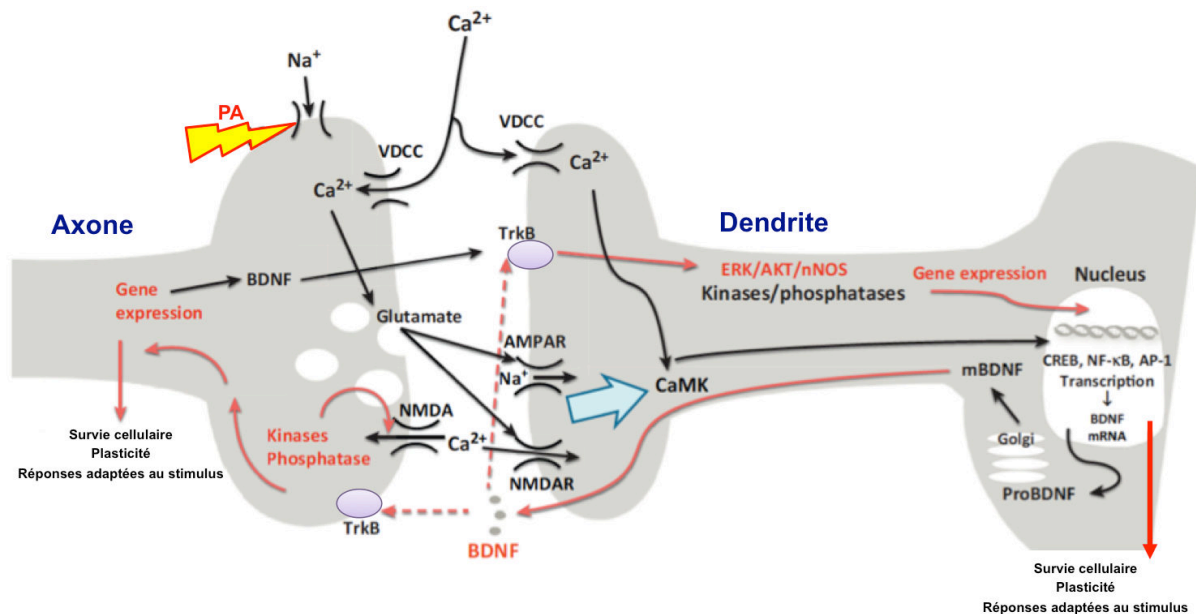
**Le BDNF**, une des neurotrophines les plus actives du SNC, joue un rôle majeur dans l'activation des mécanismes responsables de la différenciation des neurones, la survie neuronale, la repousse des neurites, l'activité synaptique et la synaptogenèse (**Figure 3.5**).

---

<sup>1</sup> Le NGF et son récepteur TrkA assurent en partie la croissance et la survie de certaines populations neuronales, telles que les neurones sympathiques, sensoriels et cholinergiques (Sofroniew *et al.*, 2001).

<sup>2</sup> À noter que lorsqu'il n'est pas précisé les préfixes « pro » ou « m », on parle du BDNF mature.

(Marosi & Mattson, 2014). En effet, cette neurotrophine augmente, par exemple, la synthèse des protéines dendritiques et le phénomène de *Long-Term Potentiation* renseignant sur la plasticité synaptique. Le BDNF est donc fortement impliqué dans la formation des circuits neuronaux dans le SNC. Il peut également prévenir de l'apoptose neuronale en favorisant l'expression des protéines anti-apoptotiques de la famille des *B-cell lymphoma 2* et en inhibant les protéines pro-apoptotiques telles que les *Bax* et *Bad*. Le BDNF participe également à l'équilibre énergétique cellulaire en augmentant le transport du glucose par l'activation les transporteurs du glucose-3, mais aussi en régulant le co-activateur transcriptionnel majeur de la synthèse de mitochondries (*PGC1- $\alpha$* , *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1- $\alpha$* ). Il est intéressant de noter que si *PGC1- $\alpha$*  est bloqué, la capacité du BDNF à induire la synaptogenèse est abolie et le nombre de synapse dans le gyrus denté de l'hippocampe est réduit.



**Figure 3.5: Effets biologiques du BDNF au niveau synaptique.** Lorsqu'un potentiel d'action arrive à la terminaison présynaptique d'un axone, les mouvements intracellulaires du  $\text{Na}^+$  dépolarisent la membrane cellulaire, déclenchant une entrée massive de  $\text{Ca}^{2+}$  et la libération de glutamate dans la fente synaptique qui se fixe sur ses récepteurs AMPA et NMDA localisés sur la membrane post-synaptique. Le  $\text{Ca}^{2+}$  entre alors dans la cellule via les récepteurs NMDA et les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  voltage-dépendant. L'activation de CaMK active les facteurs de transcription CREB et NF- $\kappa$ B qui favorisent la transcription du gène BDNF. Le mBDNF est libéré au niveau synaptique et active les récepteurs TrkB déclenchant plusieurs cascades de signalisation et ainsi l'expression de plusieurs protéines indispensables à la survie neuronale et la neuroplasticité. Le BDNF influence aussi l'excitabilité membranaire et la transmission synaptique en augmentant le nombre de vésicules synaptiques au niveau de la membrane pré-synaptique [Adapté de (Marosi & Mattson, 2014)]. CaMK:  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase ; CREB: cAMP response element-binding protein ; VDCC: Voltage-dependent calcium channels; AP-1: Activator protein 1. NMDA: N-Méthyl-D-aspartic acid; NF- $\kappa$ B: Nuclear factor-kappa B; AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionic acid.

En cas d'ischémie cérébrale, il se fixe sur le récepteur TrkB pour exercer son action neuroprotectrice (Wu & Pardridge, 1999; Kiprianova *et al.*, 1999; Schäbitz *et al.*, 2000; Nudo, 2011; Berretta *et al.*, 2014). En effet, l'augmentation du BDNF post-ischémique agit sur plusieurs processus délétères impliqués dans la cascade ischémique car il semble stabiliser la quantité de  $Ca^{2+}$  intracellulaire, augmenter l'expression d'enzymes anti-oxydantes, diminuer le nombre de cytokines pro-inflammatoires et limiter la défaillance mitochondriale, l'apoptose et le volume lésionnel (Mang *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2014). Le BDNF favoriserait également la neurogenèse au niveau de la zone sous-ventriculaire cérébrale (zone hautement plastique située dans la paroi des ventricules latéraux cérébraux) et la migration de cellules souches vers les régions adjacentes au site lésionnel. Le blocage de l'expression d'ARNm du BDNF en injectant un antagoniste réduit les habiletés motrices spécifiques suggérant un rôle bénéfique du BDNF sur la fonction motrice (Ploughman *et al.*, 2009; Clarkson *et al.*, 2011).

### 1.2.2 Réparation vasculaire et angiogenèse

La condition d'hypoxie provoquée par l'ischémie cérébrale conduit rapidement à l'expression de facteurs angiogéniques<sup>1</sup> dont le plus connu d'entre eux est le VEGF. L'action de ce dernier stimule la régénération des vaisseaux sanguins de l'endothélium en recrutant les cellules souches endothéliales circulantes EPCs (Greenberg & Jin, 2013). Son activité peut donc mener à la formation d'un accès alternatif à la perfusion sanguine *via* la genèse de nouveaux vaisseaux sanguins autour de la zone affectée par l'ischémie. L'expression de VEGF et de son récepteur VEGFR-2 (VEGF *receptor* 2) est augmentée au niveau de la *penumbra* et de la zone environnant le site lésionnel mais également dans les régions éloignées (Ma *et al.*, 2012). Les neurones, les cellules gliales et les cellules endothéliales sont les principales sources de VEGF. Les autres facteurs neurotrophiques sont également capables

---

<sup>1</sup> Substances induisant l'angiogenèse favorisant donc la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins.

de stimuler le VEGF en réponse à l'ischémie (Talwar & Srivastava, 2014). Le VEGF contribue également à la neurogenèse post-ischémie en favorisant la prolifération de nouveaux neurones au niveau du gyrus denté dans l'hippocampe et la zone sous-ventriculaire. Ces neurones nouveau-nés migrent ensuite vers la région ischémique (Greenberg & Jin, 2013).

Par ailleurs, les facteurs neurotrophiques, et notamment les neurotrophines, sont connus pour agir sur la plasticité synaptique en participant, entre autres, à l'homéostasie du  $\text{Cl}^-$  qui est essentielle pour maintenir l'équilibre électrique des cellules nerveuses du SNC mais qui est perturbée suite à une ischémie cérébrale (Rivera, 2004; Dekoninck, 2007; Kaila *et al.*, 2014). La partie suivante va développer le rôle de l'homéostasie du  $\text{Cl}^-$  (*i.e.* équilibre entre la concentration du  $\text{Cl}^-$  intra- et extracellulaire) dans le SNC sain et suite à une ischémie cérébrale.

### ***1.3 Homéostasie du $\text{Cl}^-$ et action du GABA post-ischémique***

**Le neurotransmetteur GABA dans le SNC mature.** Le  $\text{Cl}^-$  est l'anion le plus important du SNC dont la concentration intracellulaire est plus faible que sa concentration extracellulaire dans des conditions matures non-pathologiques. Sa concentration de part et d'autre de la membrane cellulaire va favoriser ou inhiber la genèse d'un potentiel action (Ben-Ari *et al.*, 2012). Le trafic du  $\text{Cl}^-$  au travers des membranes des cellules du SNC est permis par l'existence de canaux transmembranaires ionotropiques et de co-transporteurs (CCCs, *Cation-Chloride Co-transporters*) au niveau synaptique (Payne *et al.*, 2003; Blaesse *et al.*, 2009; Kaila *et al.*, 2014). Les canaux ioniques deviennent perméables au  $\text{Cl}^-$  lorsque le neurotransmetteur,  *$\gamma$ -Aminobutyric acid* ou GABA se fixe sur son récepteur  $\text{GABA}_A^1$  (Ben-Ari *et al.*, 2012). Le GABA, principalement contenu dans les interneurones, est le

---

<sup>1</sup> Récepteur ionotropique, localisé sur le canal ionique.

neurotransmetteur inhibiteur le plus important du SNC mature permettant ainsi d'établir un équilibre entre excitation et inhibition au sein du SNC (Blaesse *et al.*, 2009; Kaila *et al.*, 2014). Il est donc essentiel dans la régulation de l'activité neuronale du SNC bien qu'il ne soit présent que dans  $\approx 15\%$  des synapses. Autrement dit, les interneurons GABAergiques modulent l'excitabilité du réseau neuronal *via* son action inhibitrice au niveau des synapses (Ben-Ari *et al.*, 2012; Kaila *et al.*, 2014). Ainsi, une perturbation de l'activité GABAergique provoque un déséquilibre entre excitation et inhibition pouvant être la cause d'une hyperexcitabilité neuronale, voire d'une excitotoxicité, affectant ainsi les différentes fonctions neuronales (Dekoninck, 2007).

**Rôle des co-transporteurs du Cl<sup>-</sup> dans la réponse GABAergique.** L'ouverture du canal ionique peut laisser entrer ou sortir le Cl<sup>-</sup> en fonction de sa concentration intra- et extracellulaire. Or, la concentration du Cl<sup>-</sup> est en permanence régulée à l'état de repos par ses co-transporteurs localisés sur la membrane post-synaptique (sur le soma et dendrites), les CCCs dont le rôle est aussi important que celui des canaux ioniques. Les 2 CCCs majeurs au sein du SNC sont le NKCC1 (*Na-K-Cl co-transporter*), présent dans les neurones, les cellules gliales et les cellules endothéliales, et le KCC2 (*Potassium-chloride transporter member 5*), présent exclusivement dans les neurones matures (Payne *et al.*, 2003). Le NKCC1 permet de faire entrer le Cl<sup>-</sup> dans la cellule alors que le KCC2 permet l'extrusion du Cl<sup>-</sup>. Dans le SNC mature, la concentration intracellulaire de Cl<sup>-</sup> est faible, dû à une activité élevée de KCC2 alors que NKCC1 est présent en faible quantité. Ainsi, la fixation du GABA sur son récepteur induit une entrée massive de Cl<sup>-</sup> *via* la différence de gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane cellulaire (Ben-Ari *et al.*, 2012). L'intérieur de la cellule devient alors plus fortement chargé négativement provoquant ainsi une hyperpolarisation. Dans ces conditions, le GABA exerce une influence inhibitrice sur le neurone en question

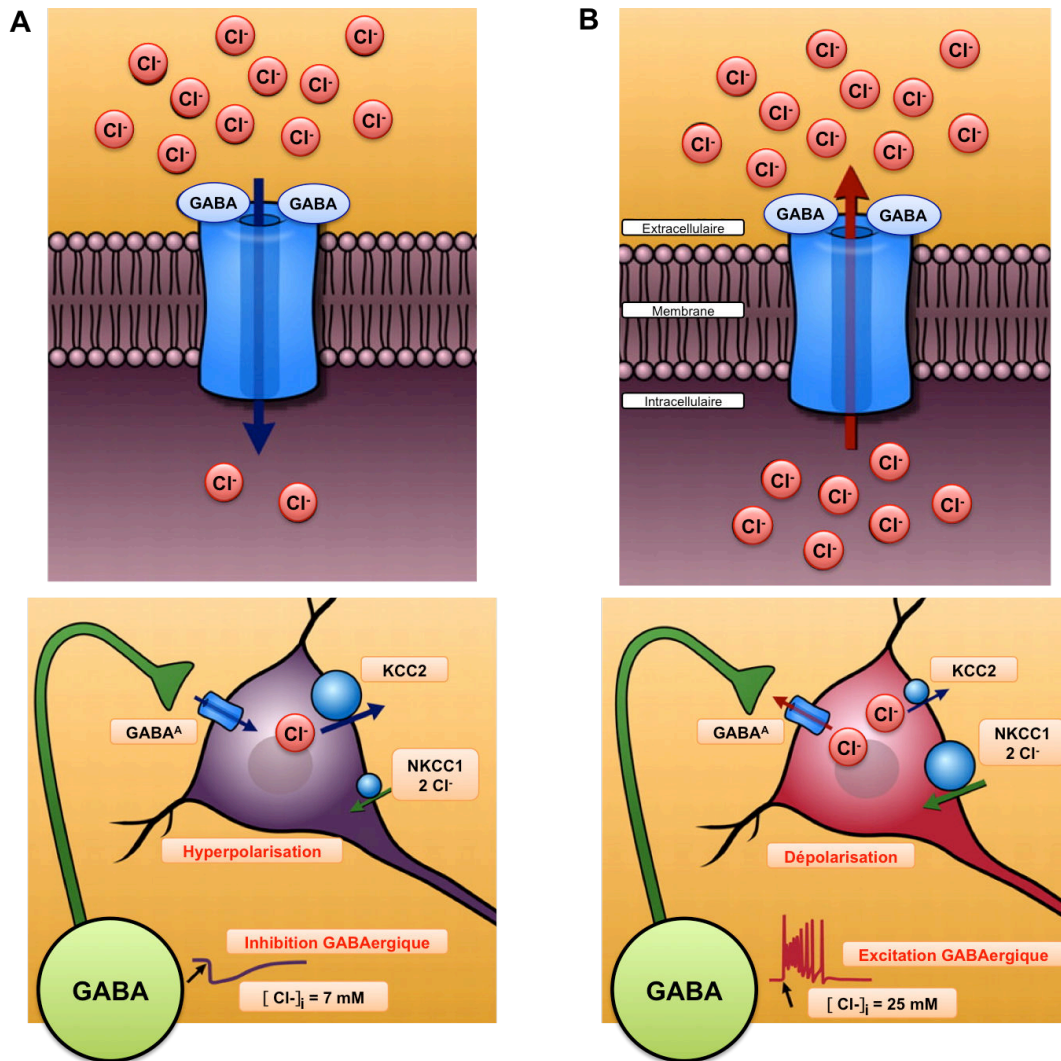
(Figure 3.6.A). Par ailleurs, ils sont très impliqués dans l'activité synaptique mais également dans la synaptogenèse (Chamma *et al.*, 2012). Cependant, les co-transporteurs du Cl<sup>-</sup> ont pendant longtemps été injustement négligés ce qui fait que leurs rôles dans la plasticité post-ischémique, entre autres, restent à démontrer (Blaesse *et al.*, 2009).

Le Cl<sup>-</sup> peut aussi sortir de la cellule par les canaux ioniques spécifiques induisant alors une dépolarisation et non une hyperpolarisation dans certaines situations dont les atteintes du SNC. En effet, le *turnover*<sup>1</sup> de KCC2 est très important (< 20 min) et est sensible aux modifications environnementales telles que les atteintes du SNC (Payne *et al.*, 2003; Rivera, 2004). En cas de traumatisme du SNC ou d'ischémie cérébrale, l'homéostasie du Cl<sup>-</sup> est perturbée car l'expression de KCC2 diminue alors que celle de NKCC1 augmente (Payne *et al.*, 2003; Jaenisch *et al.*, 2010; Shulga *et al.*, 2012). Dans ces conditions, le Cl<sup>-</sup> s'accumule dans la cellule, élevant ainsi la charge négative à l'intérieur par rapport à l'extérieur. En conséquence, la fixation du GABA sur son récepteur induit une sortie massive de Cl<sup>-</sup> provoquant une augmentation du potentiel de repos. Dans ces conditions, le GABA exerce une action dépolarisante ce qui a pour conséquence d'engendrer une hyperexcitabilité neuronale, perturbant ainsi le fonctionnement des réseaux neuronaux (Figure 3.6.B). Cependant, les répercussions de la dysfonction de la régulation du Cl<sup>-</sup> et notamment de la baisse de l'expression KCC2 reste à ce jour difficile à mettre en évidence car les rongeurs déficients en KCC2 meurent au bout de 2 jours dus à des troubles moteurs sévères et de crises d'épilepsie (Hübner *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2002). Ceci laisse tout de même suggérer que l'activité de KCC2 paraît essentiel dans le développement et/ou le maintien des capacités motrices.

---

<sup>1</sup> Représente l'équilibre entre la synthèse et la dégradation d'une protéine.



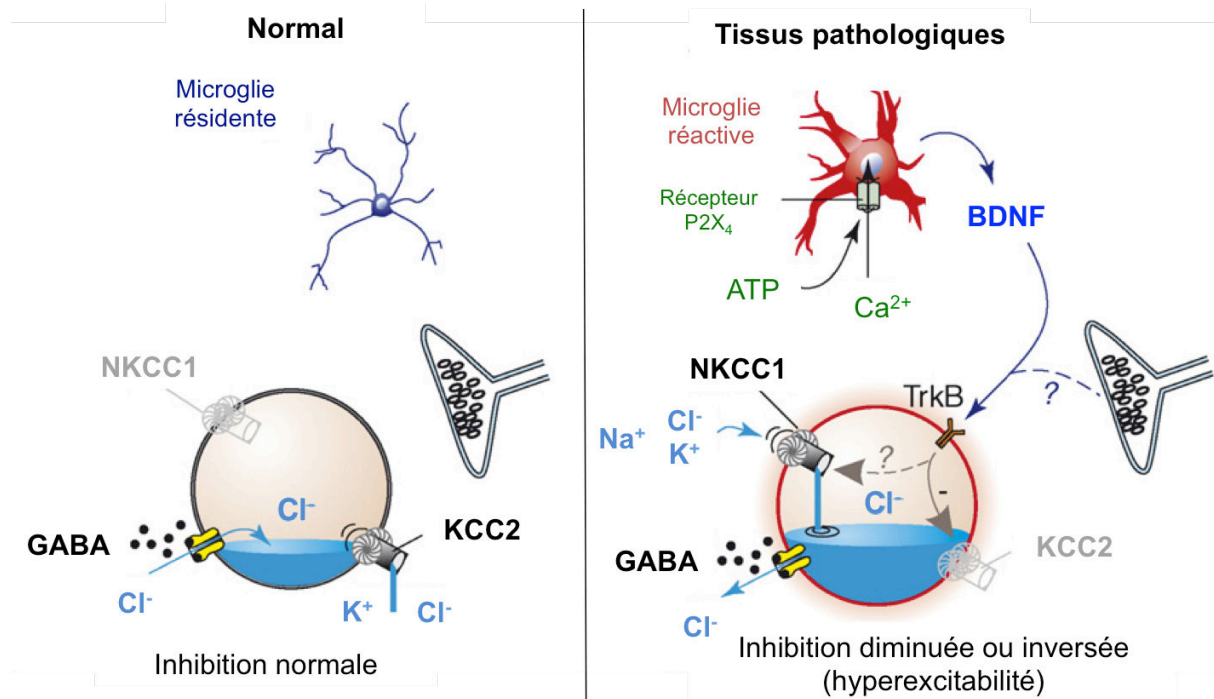


**Figure 3.6 : Rôle des co-transporteurs KCC2 et NKCC1 dans la réponse GABAergique.** (A) À l'état normal, étant donné que KCC2 est davantage actif que NKCC1, la  $[Cl^-]_i$  est suffisamment faible pour induire une entrée dans la cellule des ions  $Cl^-$ , lorsque le GABA se fixe sur son récepteur, induisant une hyperpolarisation. (B) Dans une condition pathologique, l'activité de KCC2 étant diminuée et celle de NKCC1 augmentée, la  $[Cl^-]_i$  n'est pas suffisamment importante. Ainsi, le GABA induit une sortie massive des ions  $Cl^-$  causant une dépolarisation. L'activité neuronale est alors altérée par la modification de l'équilibre entre inhibition et excitation [adaptée de (Ben-Ari *et al.*, 2007)].  $[Cl^-]_i$ : concentration intracellulaire de  $Cl^-$ .

Peu d'études ont analysé la fonction des co-transporteurs de  $Cl^-$  après une ischémie cérébrale. Jaenisch *et al.* (2010) ont évalué l'homéostasie du  $Cl^-$  en indiquant une forte diminution de l'expression de KCC2 (- 80 % par rapport aux animaux contrôles) sept jours après une ischémie cérébrale de 2 h (Jaenisch *et al.*, 2010). Bien que les preuves de l'importance de KCC2 dans le maintien des capacités motrices manquent encore, il est considéré à ce jour que restaurer l'expression de KCC2 et diminuer celle de NKCC1 est associé à une réduction de l'excitotoxicité et à une amélioration de la récupération en

rétablissant le rôle inhibiteur des récepteurs GABAergiques. Pour justifier le rôle majeur de KCC2 dans la récupération suite à diverses atteintes du SNC, plusieurs traitements visent à rétablir ce rapport NKCC1/KCC2 (Ben-Ari *et al.*, 2012; Kourdougli *et al.*, 2017). Dans le contexte de l'ischémie cérébrale, il a été montré qu'une augmentation de l'expression de KCC2 dans l'hippocampe est associée à une amélioration fonctionnelle ainsi qu'à une augmentation de la survie neuronale suite à l'application d'un traitement pharmacologique, le propofol, un antagoniste du GABA<sub>A</sub> (ici excitateur). Dans cette étude, lorsqu'un antagoniste de KCC2, l'acide [(dihydroindenyl)oxy]alkanoic est administré, l'effet neuroprotecteur du propofol est bloqué (Wang *et al.*, 2015).

Par ailleurs, KCC2 et NKCC1 sont régulés par plusieurs facteurs tels que le BDNF (Rivera, 2004; Dekoninck, 2007; Kaila *et al.*, 2014). Le BDNF libéré par la microglie réactive régule l'expression de KCC2 en exerçant un double rôle (Figure 3.7), soit en stimulant soit en inhibant l'expression de KCC2. Plusieurs études ont montré que suite à une atteinte du SNC, l'expression de KCC2 est augmentée par l'action du BDNF (Boulenguez *et al.*, 2010; Shulga *et al.*, 2012).



**Figure 3.7 :** Exemple de cascade d'événements sous-tendant la modulation de l'homéostasie du Cl<sup>-</sup> par le BDNF endogène. À l'état normal, l'action GABAergique est inhibitrice (à gauche). Dans des conditions pathologiques, l'ATP libéré par les cellules mourantes active les récepteurs P2X localisés sur la microglie. La microglie alors activée commence à sécréter du BDNF qui ce dernier, agit sur son récepteur TrkB situé au niveau des neurones induisant une diminution de l'expression de KCC2. L'extrusion du Cl<sup>-</sup> par la cellule est alors réduite augmentant la [Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>. Le gradient transmembranaire de Cl<sup>-</sup> est donc perturbé et les flux de Cl<sup>-</sup> sont inversés induisant une baisse de l'inhibition voir une dépolarisation. Bloquer la voie microglie/BDNF/TrkB restaure l'homéostasie du Cl<sup>-</sup> [adaptée de (Dekoninck, 2007)].

Comme évoqué dans l'introduction de ce chapitre, l'ensemble des mécanismes précédemment décrits peuvent être modulés par l'entraînement en endurance. Ce dernier permet d'induire une neuroprotection endogène qui peut influencer la qualité de la récupération fonctionnelle. Dans la suite de ce chapitre, l'intérêt de l'exercice prolongé pour le patient AVC ne se limitera pas aux facteurs cérébraux car ses répercussions au niveau cardiovasculaire et fonctionnel (incluant l'aptitude aérobie) seront également pris en compte de part leur importance pour la récupération. Cela nous donnera une idée plus complète de l'influence de l'exercice post-AVC. De plus, les recommandations actuelles pour l'exercice prolongé vont être remises en question à partir du choix des intensités d'exercice à adopter qui est un paramètre crucial pour déterminer l'efficacité d'un programme d'entraînement.

## 2. Influence de l'entraînement en endurance sur la récupération fonctionnelle et la neuroplasticité après une ischémie cérébrale

### 2.1 Intérêt de l'entraînement en endurance post-AVC

#### 2.1.1 Déclin de l'aptitude aérobie post-AVC

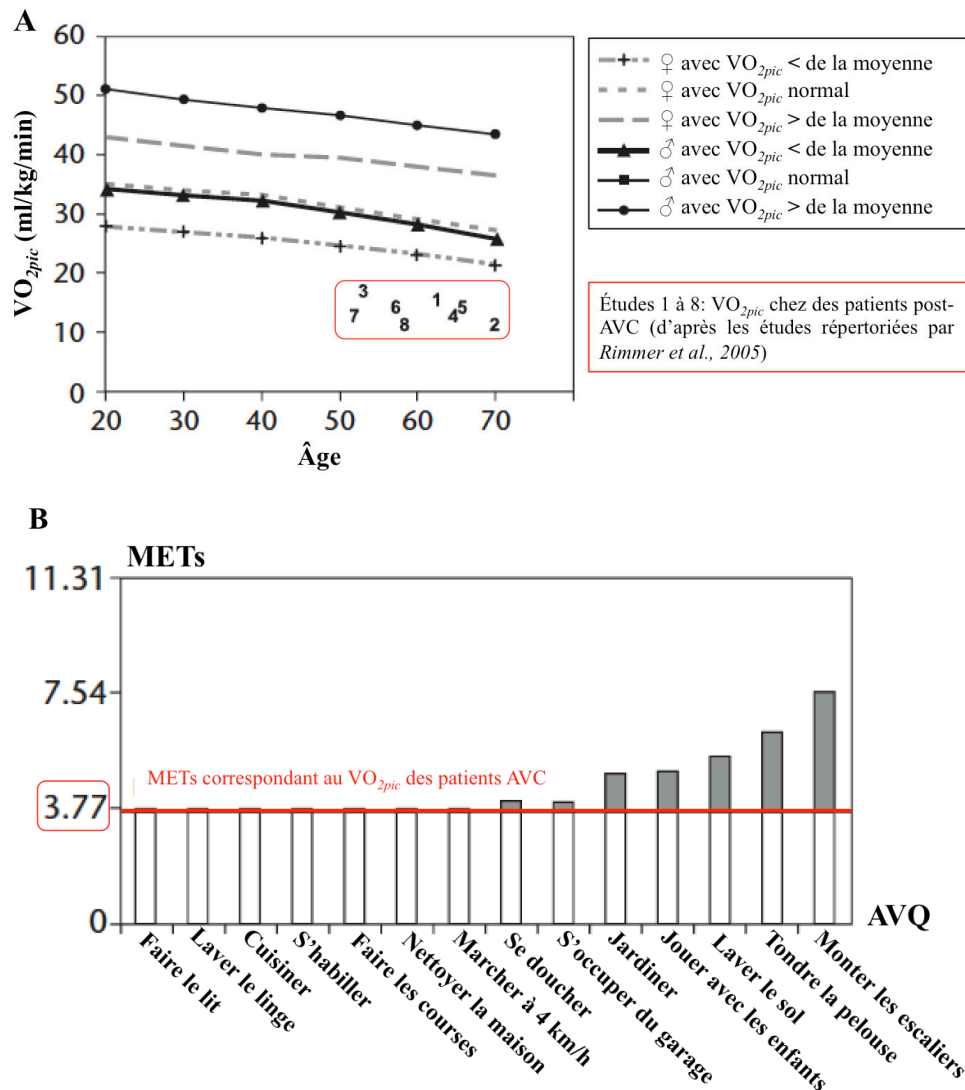
De nos jours, l'augmentation du taux de survie des patients AVC entraîne inévitablement un plus grand nombre de patients souffrant de déficits physiques résiduels (*i.e.* réduction de la mobilité, troubles de l'équilibre, faiblesse musculaire), les conduisant à un style de vie sédentaire chronique (Ivey *et al.*, 2005; Pang *et al.*, 2013). Dans les 30 jours post-AVC, l'inactivité physique amène à un déconditionnement physique qui est en partie reflété par une réduction de l'aptitude aérobie (Billinger *et al.*, 2014). Chez ces patients,  $VO_{2max}$  ne peut être atteint (*cf.* Section 4.2 - p.160), la valeur maximale mesurée est appelée "Pic" de  $VO_2$  ou  $VO_{2pic}$ . Il a été montré post-AVC, que les patients présentent un  $VO_{2pic}$  très faible, pouvant être de 50 à 70 % inférieur aux valeurs des personnes sédentaires du même âge et de même sexe (Eng *et al.*, 2004; Mackay-Lyons & Makrides, 2004). Un  $VO_{2pic}$  inférieur à 18ml/kg/min est associé d'une part à une baisse de la capacité à réaliser des tâches quotidiennes et à une diminution des performances physiques mais également à des risques de complications cardiovasculaires incluant le risque de récurrence d'AVC (Figure 3.8.A) (Marsden *et al.*, 2013). Dans ce cadre, il est indiqué que les patients post-AVC peuvent atteindre leur  $VO_{2pic}$  durant la réalisation de tâches de la vie quotidienne, pour de très faibles intensités d'exercice (Figure 3.8.B) (Ivey *et al.*, 2005; Rimmer & Wang, 2005). Ces patients présentent également une diminution du seuil ventilatoire 1 (SV1)<sup>1</sup> qui est un indicateur de  $F.VO_{2max}$  (Marzolini *et al.*, 2012; Bosch *et al.*, 2015). Enfin, le coût énergétique<sup>2</sup> de la marche

---

<sup>1</sup> Représente l'intensité d'exercice au-dessus de laquelle la ventilation augmente disproportionnellement par rapport à la consommation d' $O_2$ . Il s'agit d'un décrochage ventilatoire par rapport à l'intensité de l'exercice, observé uniquement lors d'une épreuve d'effort progressivement croissante. Ce décrochage ventilatoire est la conséquence des variations métaboliques du muscle en activité.

<sup>2</sup> Représente une quantité d'énergie consommée par unité de distance parcourue.

est 2 fois plus élevé chez les patients AVC, ce qui augmente la pénibilité de l'exercice (e.g. locomotion) et contribue à expliquer la sédentarité des patients (Danielsson *et al.*, 2007). Ce déclin précoce de la capacité aérobie retarde et entrave la participation des patients à des programmes d'exercices thérapeutiques, complique le processus de rééducation et prolonge la période de prise en charge (Stoller *et al.*, 2012).



**Figure 3.8 : Impact d'un AVC sur le VO<sub>2pic</sub> et conséquences sur les AVQ.** (A) Comme reporté par 8 études (en rouge), le VO<sub>2pic</sub> des patients AVC est ≈15 ml/kg/min. Cette valeur se trouve largement en-dessous des valeurs normales de VO<sub>2pic</sub> pour des hommes et femmes, et même en-dessous des valeurs de VO<sub>2pic</sub> des sujets normaux les plus déconditionnés. (B) Le VO<sub>2pic</sub> des patients AVC correspond à ≈3,77 METs<sup>1</sup> qui représente le coût énergétique minimum pour effectuer la plupart des AVQ. Une tâche donnée nécessite un haut pourcentage de VO<sub>2pic</sub> chez les patients AVC (100 % du VO<sub>2pic</sub> et au-delà) induisant une fatigue précoce et rendant difficile voir impossible la réalisation de la plupart des AVQ. [Adaptée de (Rimmer & Wang, 2005)]. AVQ : activité de la vie quotidienne; MET : équivalent métabolique.

<sup>1</sup> Mesure l'intensité d'une activité physique et la dépense énergétique. MET = rapport de l'activité sur la demande du métabolisme de base. Plus l'intensité de l'activité est élevée, plus le nombre de MET est élevé (1 MET = 3.5 ml/kg/min).

Afin de pallier au cercle vicieux du déconditionnement physique et des troubles physiologiques associés, l'entraînement en endurance fait partie des recommandations post-AVC. Cependant, plus de la moitié des patients post-AVC (58 %) ne suivent pas ce type de préconisation (Rand *et al.*, 2009). Les raisons du manque de participation à une activité physique à la suite d'une pathologie (non spécifiques aux patients AVC) sont multiples (Banks *et al.*, 2012):

- les patients ne sont pas conscients, par manque de connaissances, qu'ils sont capables de faire de l'activité physique, et même que cela peut être plaisant,
- les patients n'ont pas accès aux informations qui peuvent les amener à la pratique physique,
- le manque de structure et de planification des séances,
- le manque de temps lié à une prise en charge déjà lourde.

Comme pour les différents types d'exercices de rééducation fonctionnelle (**Encadré 3.1**), il existe pourtant des recommandations officielles partiellement fondées sur des preuves scientifiques.

### Encadré 3.1 | La rééducation fonctionnelle post-AVC

Il paraît important de souligner que l'exercice d'endurance n'est qu'un aspect de la prise en charge des patients AVC. Une grande proportion de la rééducation fonctionnelle implique une rééducation motrice du patient qui se définit comme l'application de méthodes thérapeutiques pratiquées manuellement ou à l'aide d'instruments dont l'objectif est la prévention secondaire, le rétablissement, l'optimisation des troubles de la fonction motrice. La plupart des méthodes de rééducation existantes s'appuient sur des concepts neurodéveloppementaux, de neurofacilitation proprioceptive, d'intégration sensitive, d'apprentissage et réapprentissage moteur, de la dimension cognitive du mouvement ou de la contrainte induite, etc. D'autres méthodes utilisent des technologies spécifiques, informatiques ou électromécaniques, telles que par exemple la réalité virtuelle, la marche sur tapis roulant avec ou sans suspension partielle du poids du corps. Selon les recommandations de la HAS (HAS, 2012), l'efficacité de la grande majorité de ces pratiques rééducatives ne repose pas sur des fondements scientifiques solides. Par exemple, l'état actuel des connaissances ne permet pas de conclure que la récupération de la sensibilité dépend des exercices proprioceptifs. De même, il est mentionné que les connaissances actuelles ne garantissent pas l'intérêt des techniques d'apprentissage moteur. Mais le point qui nous attire particulièrement dans ce rapport est qu'il stipule que l'on ne peut pas recommander à ce jour un type particulier d'activité et une durée précise d'entraînement. Outre les méthodes employées, leur posologie d'application n'est pas clairement définie.



Alors, comment est-ce que les programmes de rééducation sont-ils réalisés dans les centres de rééducation/réadaptation fonctionnelle ? Les rééducateurs composent les programmes en mélangeant les différentes approches thérapeutiques existantes selon leur expérience et les moyens disponibles. Un des points qui rassemble les différentes approches est qu'il est recommandé dans tous les cas de débiter la rééducation motrice dès que possible. En effet, il est largement accepté que la précocité de la rééducation de l'hémiplégie/hémi-parésie est un facteur d'efficacité.

### 2.1.2 Recommandations actuelles pour les entraînements en endurance suite à un AVC

Durant la dernière décennie, les recommandations sur l'entraînement d'endurance post-AVC repose sur la réalisation d'un exercice d'intensité modérée et continu (« MOD ») (Gordon, 2004) (Figure 3.9). Comme pour tout entraînement, afin d'être efficace, l'entraînement en endurance doit être individualisé en fonction de l'aptitude aérobie des patients [exprimé par exemple en pourcentage de la fréquence cardiaque de réserve (FC réserve)<sup>1</sup> ou du  $VO_{2max}$ ] (Gordon, 2004; Pang *et al.*, 2013). Au début du programme d'entraînement, il est conseillé de mettre en place des sessions d'exercices courts (*e.g.* plusieurs séries d'exercice de 2 min durant 20 min séparés par des périodes de récupération) à intensité faible (30 % de la FC réserve). Il est préconisé d'effectuer un programme d'au moins 8 semaines avec 3-5 sessions par semaine pour observer un effet positif sur le  $VO_{2pic}$  des

<sup>1</sup> Fréquence cardiaque maximale – fréquence cardiaque de repos

patients AVC chroniques (Katz-Leurer *et al.*, 2003; Pang *et al.*, 2013). Par la suite, il est conseillé d'augmenter progressivement l'intensité d'exercice de 40-50 % à 60-80 % de la FC réserve et la durée de l'exercice de 20 à 60 minutes par session (Pang *et al.*, 2006, 2013). Ce type d'entraînement est recommandé pour des patients dont la sévérité de l'AVC est faible à modérée (classe A et B de l'*American College of Sports Medicine*) (Pohl *et al.*, 2002). En effet, il paraît difficile d'appliquer cette stratégie sur des patients hémiplegiques sévères. Pour ces derniers, une approche différente de la rééducation par l'activité physique (non abordé dans ce travail de thèse) est requise.

Type d'exercice	Objectifs majeurs	Intensité/Fréquence/Durée
<p><b>Aérobic</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Activités des grands groupes musculaires (<i>e.g.</i> marche, tapis roulant, cyclo-ergomètre, ergomètre combiné jambe/bras)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Augmenter l'autonomie dans les activités de la vie quotidienne</li> <li>◆ Augmenter l'efficacité/vitesse de la marche</li> <li>◆ Améliorer la tolérance aux activités physiques prolongées</li> <li>◆ Réduire les risques de maladies cardiovasculaires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 40-70 % du <math>VO_{2pic}</math>; 40-70 % de la FC réserve; 50-80 % de la <math>FC_{max}</math>; 11-14 (échelle 6-20) de l'échelle de Borg</li> <li>◆ 3 à 7 jours/semaine</li> <li>◆ 20-60 minutes/session (ou plusieurs sessions de 10 min)</li> </ul>
<p><b>Souplesse</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Étirements</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Augmenter l'amplitude des mouvements</li> <li>◆ Prévenir les contractures</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 2 à 3 jours/semaine (avant ou après l'entraînement aérobic ou en force)</li> <li>◆ Tenir chaque étirement durant 10 à 30 secondes</li> </ul>
<p><b>Neuromusculaire</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Activités de coordination et d'équilibre</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ Améliorer le niveau de sécurité durant les activités de la vie quotidienne</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 2 à 3 jours/semaine</li> </ul>

F<sub>cm</sub>: fréquence cardiaque maximale; FC réserve: fréquence cardiaque de réserve

**Figure 3.9** : Les différents types d'exercices recommandés post-AVC. Les caractéristiques des exercices d'endurance sont encadrées en rouge. [Adapté de (Gordon, 2004)].

Pour les patients AVC, les tests incrémentaux et les entraînements de type « MOD » sont considérés comme étant sans risques puisqu'ils n'induisent pas de risques cardiovasculaires particuliers. Par exemple, Marzolini *et al.* (2012) ont indiqué que sur 349 tests incrémentaux effectués au cours de leur étude, aucun problème médical n'a été à déplorer (Marzolini *et al.*, 2012). Il semble peu probable que l'entraînement en endurance présente un risque de troubles cardiovasculaires chez le patient AVC. Le risque principal semble être lié au choix de l'ergomètre. En effet, si, le tapis roulant et le cyclo-ergomètre sont



les modalités d'exercices les plus utilisées par les patients pour effectuer les entraînements en endurance, l'exercice de pédalage représente la modalité la plus sûre pour un patient dont les capacités fonctionnelles sont diminuées (Gordon, 2004; Pang *et al.*, 2013; Marsden *et al.*, 2013) (Encadré 3.2).

### Encadré 3.2 | Modalité d'exercice chez le patient AVC: tapis roulant ou cyclo-ergomètre?

Il est fréquemment conseillé aux patients AVC de réaliser les exercices d'endurance sur tapis roulant et/ou sur cyclo-ergomètre (Marsden *et al.*, 2013 ; Gordon *et al.*, 2004 ; Pang *et al.*, 2013). Le choix de la modalité d'exercice dépend des capacités fonctionnelles du patient et de ce qui paraît le plus sécurisant. Le cyclo-ergomètre est fortement conseillé chez les patients présentant des déficits importants de l'activité posturale afin de limiter les chutes durant l'exercice mais aussi pour les patients AVC présentant des troubles cognitifs (Billinger *et al.*, 2014 ; Pang *et al.*, 2013). De plus, le cyclo-ergomètre permet de fixer les pieds aux pédales limitant ainsi l'influence des déficits des membres inférieurs (Tang *et al.*, 2006). En revanche, le problème majeur d'un test incrémental sur cyclo-ergocycle est lié au fait que l'arrêt de l'exercice est souvent associé à une fatigue importante au niveau musculaire, réduisant ainsi la production de force (comme chez le le sujet sain non cycliste). Ceci signifie que le patient AVC s'arrête de pédaler avant d'atteindre la limite maximale du système aérobie. Néanmoins, même sur tapis roulant, il est considéré comme peu probable que les sujets atteignent leur «vrai» VO<sub>2</sub>max de part leurs limites en termes de production de force, coordination, contrôle sensorimoteur et même de déficits cognitifs.



## 2.2 Effets sur les adaptations cardiovasculaires et métaboliques chez le patient AVC

Dans la littérature récente, il a été montré que le entraînement de type « MOD » limite les complications liées au déconditionnement physique en induisant une amélioration de la capacité cardiorespiratoire, de la tolérance à l'exercice, de la qualité de vie, une réduction des risques de pathologies cardiovasculaires ainsi que des récives d'AVC (Marsden *et al.*, 2013). Dans ce type de population, ce type d'entraînement améliore les composantes de l'aptitude aérobie avec par exemple, une amélioration de 9 à 15 % du VO<sub>2pic</sub> selon l'aptitude physique du sujet en début de période d'entraînement (Tang *et al.*, 2013). De même, Macko *et al.* (1997) ont observé une réduction du coût énergétique de 21 % lors d'une tâche de marche standardisée sur tapis roulant après 12 semaines d'entraînement (Macko *et al.*, 1997). Il permet également aux patients d'atteindre de plus hautes charges de travail, avec par exemple

une augmentation de la production de puissance de travail sur cyclo-ergomètre ou en marche avec une augmentation de l'endurance et de la vitesse de marche [Test de Marche de 6 min (TM-6) ou Test de Marche de 10 mètres (TM-10)] (Potempa *et al.*, 1995; Macko *et al.*, 2005; Lam *et al.*, 2010; Globas *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2013; Marsden *et al.*, 2013).

Ces améliorations de l'aptitude aérobie peuvent être reliées aux effets positifs de cet entraînement sur les adaptations vasculaires. Billinger *et al.* (2009) ont montré que l'entraînement d'endurance réalisé sur un seul membre parétique induit une augmentation du diamètre de l'artère fémorale et de la vitesse du débit sanguin (+ 42 %) suggérant une augmentation de la perfusion musculaire (Billinger *et al.*, 2009). Ivey *et al.* (2010) confirment ces résultats et montrent après 6 mois d'entraînement sur tapis roulant, une amélioration de la perfusion sanguine au niveau des membres inférieurs (parétique et non-parétique) alors que celle-ci n'est pas observée lors de la rééducation post-AVC sans exercice d'endurance à base d'exercice de souplesse ou de renforcement musculaire (Ivey *et al.*, 2010). Ce même groupe rapporte également une amélioration de la fonction vasomotrice cérébrale bilatérale positivement corrélée à une augmentation du  $VO_{2pic}$  (+19 %) après 6 mois d'un entraînement en endurance indiquant que ce type d'exercice favorise la perfusion sanguine cérébrale post-AVC (Ivey *et al.*, 2011). Cette observation représente un résultat intéressant puisqu'une amélioration de la vasomotricité cérébrale permettrait de réduire les risques de récurrences d'AVC et le volume lésionnel (Ivey *et al.*, 2011). La pression systolique est également diminuée pour des charges sous-maximales durant un test d'effort incrémental après 10 semaines d'entraînement suggérant que l'entraînement de type MOD permet également de diminuer les risques de récurrences d'AVC *via* une baisse de la pression artérielle (Potempa *et al.*, 1995). Enfin, la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline sont tout autant améliorées ce qui réduit la résistance à l'insuline fréquemment observée chez ces patients et réduit les troubles cardiovasculaires (Ivey *et al.*, 2007).

Peu d'informations sont disponibles sur les effets d'un entraînement de type MOD sur la plasticité cérébrale chez le patient AVC. La réorganisation cérébrale post-entraînement est essentiellement étudiée au travers de modifications de l'activité neuronale lors du mouvement du membre inférieur parétique grâce à l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle<sup>1</sup> avant et après entraînement. Après plusieurs semaines d'entraînement en endurance, il a été montré chez des patients AVC chroniques une corrélation positive entre une augmentation de la vitesse de marche et une augmentation de l'activité neuronale du cortex sensorimoteur primaire, du striatum, des aires motrices cingulaires, du thalamus de l'hémisphère affecté, du cervelet et du tronc cérébral (Luft *et al.*, 2008; Enzinger *et al.*, 2009).

### ***2.3 Effets sur la neuroinflammation et la neuroplasticité post-ischémique chez le rongeur***

Dans la littérature récente, il a été montré chez le rongeur que l'activité physique peut atténuer les altérations sensorimotrices en réduisant le volume lésionnel durant les premières semaines après l'ischémie cérébrale (Arya *et al.*, 2011; Nudo, 2011; Schmidt *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'entraînement en endurance stimulerait une neuroplasticité bénéfique impliquée dans l'amélioration des fonctions sensorimotrices (Kawamata *et al.*, 1996). L'entraînement de plusieurs semaines influencerait plusieurs mécanismes interdépendants dans la plupart des zones cérébrales comme la modulation de la réponse inflammatoire, la libération des facteurs neurotrophiques et la plasticité synaptique (Jensen & Yong, 2014; van Praag *et al.*, 2014; Svensson *et al.*, 2015).

---

<sup>1</sup> Technique d'imagerie permettant de visualiser de manière indirecte l'activité cérébrale. Elle repose sur l'analyse des variations hémodynamiques (variation des propriétés du flux sanguin) cérébrales locales minimes, lorsque ces zones sont stimulées. La localisation des zones cérébrales activées est basée sur l'effet BOLD (Blood Oxygen Level Dependant), lié à l'aimantation de l'hémoglobine contenue dans les globules rouges du sang.

**Effet de l'entraînement en endurance sur la réponse inflammatoire.** Des études récentes ont montré que l'entraînement en endurance peut atténuer les dommages cérébraux en diminuant la réaction inflammatoire aiguë et l'apoptose neuronale dans la région environnant l'infarctus, tout en augmentant le score neurologique des animaux (Zhang *et al.*, 2013a). En effet, après un programme d'entraînement, on observe une augmentation du facteur neurotrophique midkine, qui est une protéine pouvant retarder les processus de mort neuronale durant la phase aiguë de l'ischémie, dans les cellules environnantes la région infarctée (Matsuda *et al.*, 2011). La mort cellulaire est également liée à une autophagie<sup>1</sup> inappropriée (Puyal *et al.*, 2009). Dans ce cadre Zhang *et al.* (2013a) ont montré que l'entraînement physique limite l'accumulation d'autophagosomes<sup>2</sup> et augmente l'expression d'IGF-1 connu pour restreindre l'autophagie et favoriser la neurogenèse (Zhang *et al.*, 2013a).

L'activité physique modifie également l'action des cellules microgliales. En effet, un entraînement de 30 min par jour sur tapis roulant à une intensité faible (5 m/min) diminue l'activation de la microglie dans l'hypothalamus (Svensson *et al.*, 2015). De plus, 30 min par jour de course à 12 m/min peut amener à un transfert du phénotype M1 à M2 de la microglie associée à une diminution de la surexpression des récepteurs pro-inflammatoires, les TLR2 et TLR4 ainsi que le NF- $\kappa$ B (*nuclear factor-kappa B*) et les MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*) (Ma *et al.*, 2012). Il est fortement suggéré que cela pourrait renforcer la libération de facteurs neurotrophiques. Chez la souris saine, il a été montré que l'exercice à haute intensité amène à une diminution des cytokines pro-inflammatoires et à une augmentation de celles anti-inflammatoires, qui sont fortement corrélées à la neuroprotection (Liesz *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012). Ces différents travaux indiquent que l'entraînement peut positivement réguler la microglie en augmentant la proportion de microglie qui favorise

---

<sup>1</sup> Dégradation d'une partie du cytoplasme par la cellule elle-même.

<sup>2</sup> Vacuole contenant des constituants du cytoplasme.

la neuroprotection (Jensen & Yong, 2014). Ces résultats font de la microglie une cible privilégiée pour les traitements, dont l'activité physique.

**Effets de l'entraînement en endurance sur les neurotrophines.** Malgré l'augmentation du niveau basal des neurotrophines (tel que BDNF/TrkB) dans les deux hémisphères en réponse à l'ischémie cérébrale, la récupération fonctionnelle reste insuffisante (Kokaia *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2005; Berretta *et al.*, 2014). Par conséquent, le recours à des stratégies favorisant la production de BDNF et de ses récepteurs est nécessaire (Schäbitz *et al.*, 1997; Mang *et al.*, 2013; Berretta *et al.*, 2014). Sur des modèles de rongeur, il est montré que l'administration de BDNF au niveau du site lésionnel réduit le volume lésionnel et les dommages cellulaires de l'ischémie et limite les processus d'apoptose et de nécrose (Abe, 2000; Ma *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2014). Cependant, l'effet bénéfique de l'administration de neurotrophines dans les essais cliniques reste à démontrer car les neurotrophines présentent une demi-vie assez courte et l'administration périphérique rend difficile l'infiltration de ces molécules sur le site lésionnel dû à la faible perméabilité de la BHE (Cai *et al.*, 2014; Berretta *et al.*, 2014). Il faudrait alors injecter des quantités massives et répétitives de neurotrophines, ce qui peut être néfaste pour l'être humain (Wahl *et al.*, 1992). Il paraît donc essentiel de favoriser la stimulation endogène de ces facteurs neurotrophiques directement aux alentours du site lésionnel.

Dans ce cadre, l'effet bénéfique de l'entraînement en endurance est suggéré puisqu'il stimule l'expression endogène de BDNF/TrkB dans les deux hémisphères, et tout particulièrement dans celui non-lésé (Kawamata *et al.*, 1996; Schäbitz *et al.*, 1997, 2000; Kiprianova *et al.*, 1999; Cupini *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; Ke *et al.*, 2011). Plusieurs études ont montré un effet à court terme de l'entraînement en endurance puisque sept jours d'entraînement consécutifs ont suffi pour augmenter l'expression de BDNF et améliorer en

parallèle la récupération motrice (Kokaia *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2005). Bien qu'il n'y ait pas de démonstration d'un lien direct, l'augmentation de l'expression de BDNF liée à un entraînement est souvent associée à l'amélioration de la récupération motrice (Schäbitz *et al.*, 1997; Cupini *et al.*, 2001; Ke *et al.*, 2011). Si les voies par lesquelles l'entraînement favorise l'expression de BDNF et de son récepteur ne sont pas totalement élucidées, de nombreuses études indiquent que le niveau de BDNF/TrkB est partiellement dépendant de l'entrée de  $Ca^{2+}$  dans la cellule induisant d'une part la fusion des vésicules contenant le BDNF avec la membrane cellulaire, et d'autre part, une augmentation de la quantité de récepteurs sur sa surface (Du *et al.*, 2000; Danglot *et al.*, 2006). Ainsi, une élévation de l'activité neuronale *via* l'exercice pourrait être une des voies responsables de l'expression de cette neurotrophine et de son récepteur spécifique. L'entraînement en endurance facilite la conversion du proBDNF vers la forme mBDNF<sup>1</sup> ce qui est corrélé à des gains fonctionnels (Sartori *et al.*, 2011). Suite à une ischémie cérébrale, un entraînement en endurance de 7 jours favorise l'augmentation du taux de mBDNF et diminue celui du proBDNF dans les régions peri-ischémiques et dans l'hippocampe au niveau ipsilatéral (Quirié *et al.*, 2012). L'activité physique peut aussi augmenter le niveau d'autres facteurs neurotrophiques tel que le GDNF post-ischémique (Jensen & Yong, 2014).

La réponse à un entraînement physique du NGF/TrkA semble moins bien établie que celle de la voie BDNF/TrkB chez des animaux présentant une ischémie cérébrale. Quelques études seulement montrent que l'expression de NGF/TrkA augmente dans le cortex ipsilésionnel suite à un entraînement dont les intensités sont modérées ou élevées (Matsuda *et al.*, 2011; Ploughman *et al.*, 2015). Bien que cette augmentation soit tardive (*i.e.* après 15 jours), l'expression de NGF est associée à une réduction des dommages cérébraux ainsi qu'à l'amélioration des fonctions motrices (Matsuda *et al.*, 2011).

---

<sup>1</sup> Le BDNF peut être observé sous forme de précurseur (ProBDNF) ou sous forme mature (mBDNF). Leurs effets sont opposés. Le proBDNF peut induire la mort neuronale par apoptose alors que le mBDNF favorise la survie neuronale et la synaptogenèse.

Comme précédemment évoqué, p75<sup>NTR</sup> joue un rôle important de part son interaction avec les autres récepteurs dans la fonction des neurotrophines, ce qui en fait une cible thérapeutique. Dans ce cadre, l'enjeu est d'amplifier les effets bénéfiques de p75<sup>NTR</sup> au niveau cérébral (Meeker & Williams, 2015). Pourtant, une seule étude réalisée sur des rats âgés montre que l'exercice induit une augmentation de p75<sup>NTR</sup> qui a été associée à une augmentation de la survie des neurones endommagés, à l'activation de l'apoptose pour éliminer les neurones affectés, à un contrôle de l'inflammation et à la repousse axonale (Vilela *et al.*, 2016).

**Effets de l'entraînement en endurance sur la neurogenèse.** Plusieurs études rapportent que la mort neuronale dans le striatum et le cortex induit une dégénération des neurones dopaminergiques, qui sont connus pour contribuer à la régulation de l'activité motrice (Zhang *et al.*, 2013c). Or, l'entraînement en endurance favorise la régénération des axones en provenance des projections striato-nigrales et cortico-nigrales, accompagnée d'une amélioration de la fonction motrice suggérant ainsi que l'exercice peut stimuler la restauration des circuits neuronaux fonctionnels dans les ganglions de la base (Zhang *et al.*, 2013c). Les déficits moteurs observés après une ischémie cérébrale, tels que la perte de la coordination motrice, l'apprentissage moteur et l'équilibre suivant une ischémie cérébrale, semblent provenir en partie d'une atteinte du cervelet. Mizutani *et al.* (2010) ont montré que l'entraînement favorise également la synaptogenèse et l'excroissance des neurites dans le cervelet ainsi que la sécrétion de GFAP (cette dernière joue un rôle dans la croissance axonale). Ces modifications structurelles sont parallèles à une amélioration de la coordination motrice (Mizutani *et al.*, 2010). Il est à noter que l'effet de l'entraînement sur l'expression de KCC2 et NKCC1 n'a jamais été étudié suite à une ischémie cérébrale. En revanche, il a été montré chez des animaux ayant subi une lésion de moelle épinière que l'entraînement permet

de retrouver un niveau de KCC2 et NKCC1 similaire aux contrôles dans la région lombaire de la moelle épinière ce qui est associé à une récupération de l'activité des réflexes somatiques, incluant une restauration de l'inhibition réflexe. Les auteurs rajoutent que l'effet de l'exercice sur l'activité nerveuse est masqué lorsque KCC2 est bloqué pharmacologiquement (Côté *et al.*, 2014). L'exercice physique semble donc avoir une influence sur l'homéostasie du Cl<sup>-</sup>. L'hypothèse serait dans notre cas que si l'exercice agit sur la microglie et la libération de neurotrophines, l'activité des co-transporteurs du Cl<sup>-</sup> devrait être également modifié suite à l'entraînement chez les animaux ayant subi une ischémie cérébrale.

**Effets de l'entraînement en endurance sur les facteurs vasculaires.** Quelques études cliniques et précliniques ont apporté des arguments sur l'efficacité de l'entraînement en endurance sur la stimulation de l'angiogenèse au niveau de la *penumbra* ischémique et l'activité vasomotrice contribuant à limiter les dommages cérébraux et les déficits sensorimoteurs (Gertz *et al.*, 2006; Ivey *et al.*, 2011). L'angiogenèse a été mise en avant en montrant une augmentation de l'expression de l'angiopoïétine (Hansen *et al.*, 2008; Hermann & Zechariah, 2009; Ke *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2014). Cette dernière joue aussi un rôle clé dans la formation de nouveaux vaisseaux. D'autres résultats révèlent que le PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule*), un autre marqueur de l'angiogenèse, est augmenté autour de l'infarctus après plusieurs jours d'entraînement sur tapis roulant (Matsuda *et al.*, 2011). L'expression de la GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*), impliquée dans la plasticité vasculaire, est également stimulée induisant potentiellement une néovascularisation cérébrale (Mizutani *et al.*, 2010). Les programmes d'entraînement augmentent les EPCs aussi connues pour fortement influencer l'expression du monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS) (Tian *et al.*, 2013). Enfin, seulement 3 jours d'exercice d'endurance suffisent à



réduire l'apoptose des cellules endothéliales au niveau cérébral, contribuant à favoriser le débit sanguin cérébral (Tian *et al.*, 2013).

**Intégrité de la barrière hémato-encéphalique.** L'entraînement limite l'altération de la BHE en réduisant l'expression de MMP-9 et en augmentant en parallèle l'expression d'un inhibiteur du MMP-9, le TIMP-1 (protéines inhibitrices des métalloprotéases-1). Ces mécanismes pourraient contribuer à diminuer les déficits neurologiques, le volume de l'infarctus et l'œdème cérébral (Zhang *et al.*, 2013d).

L'ensemble de ces données met en évidence le rôle majeur des programmes d'endurance pour favoriser la neuroplasticité et la récupération fonctionnelle. Cependant, bien que plusieurs arguments le suggèrent dans la littérature, aucune étude n'a, à notre connaissance, étudiée les effets de l'entraînement sur la neuroinflammation et sur la plasticité cérébrale suite à une ischémie cérébrale (Jensen & Yong, 2014; Svensson *et al.*, 2015). Dans toutes les études ci-dessus, les programmes d'endurance proposés sont construits de manière empirique et donc très différents d'une étude à l'autre. Cette hétérogénéité ne permet pas de déterminer l'intensité et le volume d'exercice optimaux ainsi que la fréquence d'entraînement la plus appropriée aux patients AVC. Parmi ces paramètres d'entraînement en endurance, il a été montré qu'une augmentation du volume d'exercice ou de l'augmentation du temps de prise en charge du patient ne montre pas d'effets supérieurs sur la récupération fonctionnelle (Kwakkel *et al.*, 2004; Balaban *et al.*, 2011). Cette observation est similaire à celle reportée chez le sujet sain entraîné où une augmentation de la durée des entraînements sous-maximaux ne provoque ni d'amélioration de la performance d'endurance ni de celle des paramètres physiologiques associés tels que le  $VO_{2max}$ , les seuils ventilatoires, l'économie de mouvement et les capacités oxydatives musculaires. Pour induire des gains supplémentaires de la

performance de cette population, il est fortement recommandé d'augmenter que l'intensité d'exercice. Ainsi, l'intensité de l'entraînement ou la gestion de la charge de travail dans le temps sont les paramètres d'influence de l'efficacité d'un entraînement d'endurance (Costill *et al.*, 1988; Laursen & Jenkins, 2002).

### 3. Le rôle potentiel de l'intensité d'exercice dans la rééducation post-AVC

#### 3.1 Facteurs d'optimisation de l'entraînement en endurance ?

Malgré les recommandations actuelles sur les interventions post-AVC, les effets bénéfiques de l'entraînement MOD restent tout de même insuffisants sur la fonction cardiovasculaire et la récupération fonctionnelle que ce soit chez le patient AVC chronique (> 6 mois) ou en phase aigüe/subaigüe (> 7 jours) (Stoller *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2013; Marsden *et al.*, 2013). En effet, plusieurs méta-analyses indiquent une augmentation moyenne du  $VO_{2pic}$  relativement faible et comprise entre + 7 à + 15 % après entraînement (Rimmer & Wang, 2005; Stoller *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2013; Marsden *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2014). De plus, l'économie de course n'est pas systématiquement améliorée post-entraînement dans toutes les études (seulement 3 études sur 6) et peu de données sont disponibles sur la fraction de  $VO_{2pic}$  soutenue par les patients (identifiée à partir du seuil ventilatoire).

Par ailleurs, les effets bénéfiques de l'entraînement de type MOD ne s'observent pas systématiquement sur toutes les fonctions motrices telles que l'activité posturale (*e.g.* l'équilibre) ou encore les performances dans les activités quotidiennes (mesurées par le test *Barthel Index*<sup>1</sup> ou le *Functional Independence Measure*<sup>2</sup>) (Bateman *et al.*, 2001; Stoller *et al.*, 2012; Pang *et al.*, 2013; Marsden *et al.*, 2013). Les progrès observés après un entraînement d'endurance au niveau de la vitesse de marche des patients AVC restent controversés car cette

---

<sup>1</sup> Cet index mesure la capacité d'autonomie et de mobilité de patient AVC dans la réalisation des tâches de la vie quotidienne *i.e.* se laver, manger, s'habiller, se déplacer.

<sup>2</sup> Indicateur de base évaluant la capacité fonctionnelle des patients AVC.

amélioration est très variable (de 9,2 % à 63,8 %) avec seulement 2 études sur 5 qui montrent une différence significative sur ce paramètre (Pang *et al.*, 2013; Marsden *et al.*, 2013). Une seule étude montre une amélioration des fonctions sensorimotrices, évaluée à partir de l'index de *Fugl-Meyer*<sup>1</sup> significativement corrélée avec une augmentation de l'aptitude aérobie (Potempa *et al.*, 1995).

Par ailleurs, Tang *et al.* (2013) suggèrent qu'une intensité d'exercice située aux alentours des 50 % de la FC réserve ne représente pas un stimulus suffisant pour induire des effets bénéfiques pour tous les niveaux de sévérité de l'AVC (Tang *et al.*, 2013). Or, Globas *et al.* (2011) ont montré que l'exercice réalisé à de plus hautes intensités de travail (toujours dans les limites du métabolisme aérobie *i.e.*  $\leq$  à 100 %  $VO_{2pic}$ ) pouvait être une alternative pertinente au faible stimulus induit par l'entraînement modéré et se traduisait par des performances supérieures à celle d'une prise en charge traditionnelle sans complications secondaires chez le patient AVC (Globas *et al.*, 2012). A ce jour, peu d'études ont porté sur l'entraînement à haute intensité chez le patient post AVC, et les données ne permettent pas de conclure à une efficacité accrue à un exercice d'intensité modérée pour favoriser la récupération et stimuler la neuroplasticité adaptative chez le patient AVC. Cependant plusieurs études récentes chez le sujet sain et ou atteint de pathologies cardiovasculaires ou métaboliques montrent l'intérêt d'un entraînement de type haute intensité comparé à l'entraînement modéré (Laursen & Jenkins, 2002; Gibala *et al.*, 2012; Kessler *et al.*, 2012). Cependant, pour renforcer l'importance de l'intensité d'exercice, il a été montré sur des patients post-AVC, qu'un entraînement en endurance induisait davantage de bénéfices sur la pression systolique et diastolique de repos lorsque l'intensité était plus élevée (60-69 % *vs.* < 50 % de la FC réserve) même si la durée est plus courte (30 *vs.* 60 min) (Rimmer & Wang,

---

<sup>1</sup> Index évaluant les performances fonctionnelles spécifiques aux AVC

2005). L'intensité d'exercice semble donc être un prédicteur important de la réponse physiologique à un programme d'endurance chez le patient AVC.

### 3.2 « *High-intensity Interval Training* » : caractéristiques d'un exercice d'endurance de haute intensité

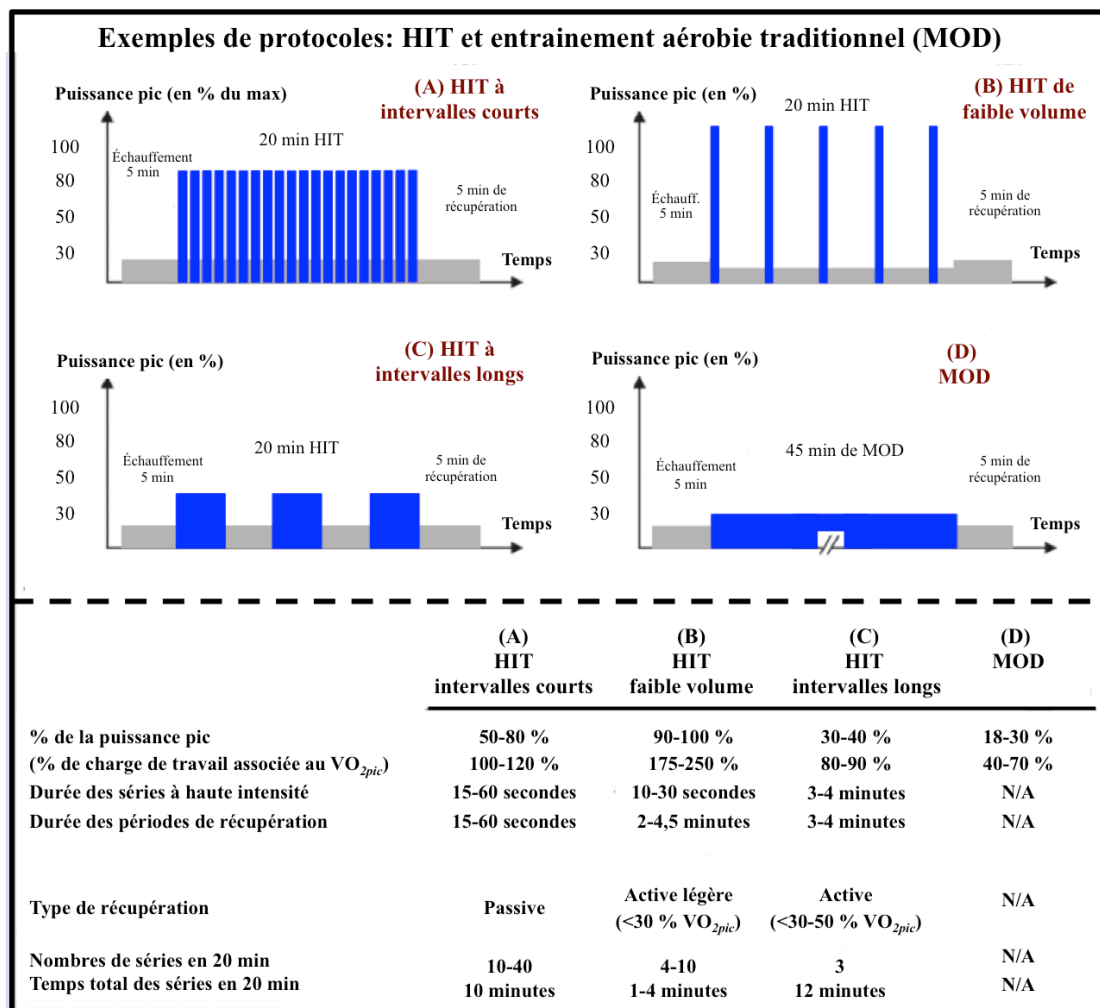
Le *High-intensity Interval Training* ou HIT représente une des principales méthodes d'entraînement aérobic employée pour travailler à haute intensité d'exercice. Les HIT se définissent comme des séries répétées d'exercices brefs et intenses séparées par des périodes de récupération active ou passive. Ainsi, l'intégration de périodes de récupération rend possible l'atteinte de zones d'intensités élevées dans le but d'atteindre et de maintenir (plusieurs minutes par séance) de hauts pourcentages du  $VO_{2pic}$  (Buchheit & Laursen, 2013). L'utilisation des HIT est basée sur l'hypothèse que travailler à de plus grandes intensités d'exercice stimulerait efficacement le transport et les systèmes d'utilisation de l'oxygène pouvant induire des améliorations importantes du  $VO_{2pic}$ . Ce type d'entraînement permet de prolonger les gains de performance d'endurance et les adaptations physiologiques associées, initiés par la répétition d'exercices sous-maximaux (MOD (Laursen & Jenkins, 2002).

Il existe une grande variété de HIT car il est possible de moduler 1) l'intensité ou le volume de travail, 2) le temps de récupération entre les séries, 3) le mode de récupération (active ou passive), 4) le nombre de répétitions par série et 5) la modalité d'exercice (cycloergomètre, tapis roulant *etc.*). Parmi les multiples combinaisons possibles, on peut distinguer 3 grandes catégories de HIT en fonction de l'intensité de travail:

- **HIT « aérobic »** où l'intensité d'exercice est généralement fixée autour de 85-100 % du  $VO_{2pic}$ .
- **HIT « anaérobic »** où l'intensité d'exercice est fixée autour de 100-130 % du  $VO_{2pic}$ .

- HIT « *Sprint Interval training* », ou « *all-out* », où l'intensité d'exercice est supramaximale.

Dans l'étude n°3, nous avons opté pour les HIT aérobie de type « intervalles longs » (Figure 3.10) car ce type de HIT permet d'augmenter le temps passé à une intensité proche de  $VO_{2pic}$ . Ce choix est en accord avec plusieurs travaux sur l'AVC où ce type d'exercice s'est révélé non seulement faisable mais aussi sans risque de complications secondaires pour les patients (Gjellesvik *et al.*, 2012; Askim *et al.*, 2014).



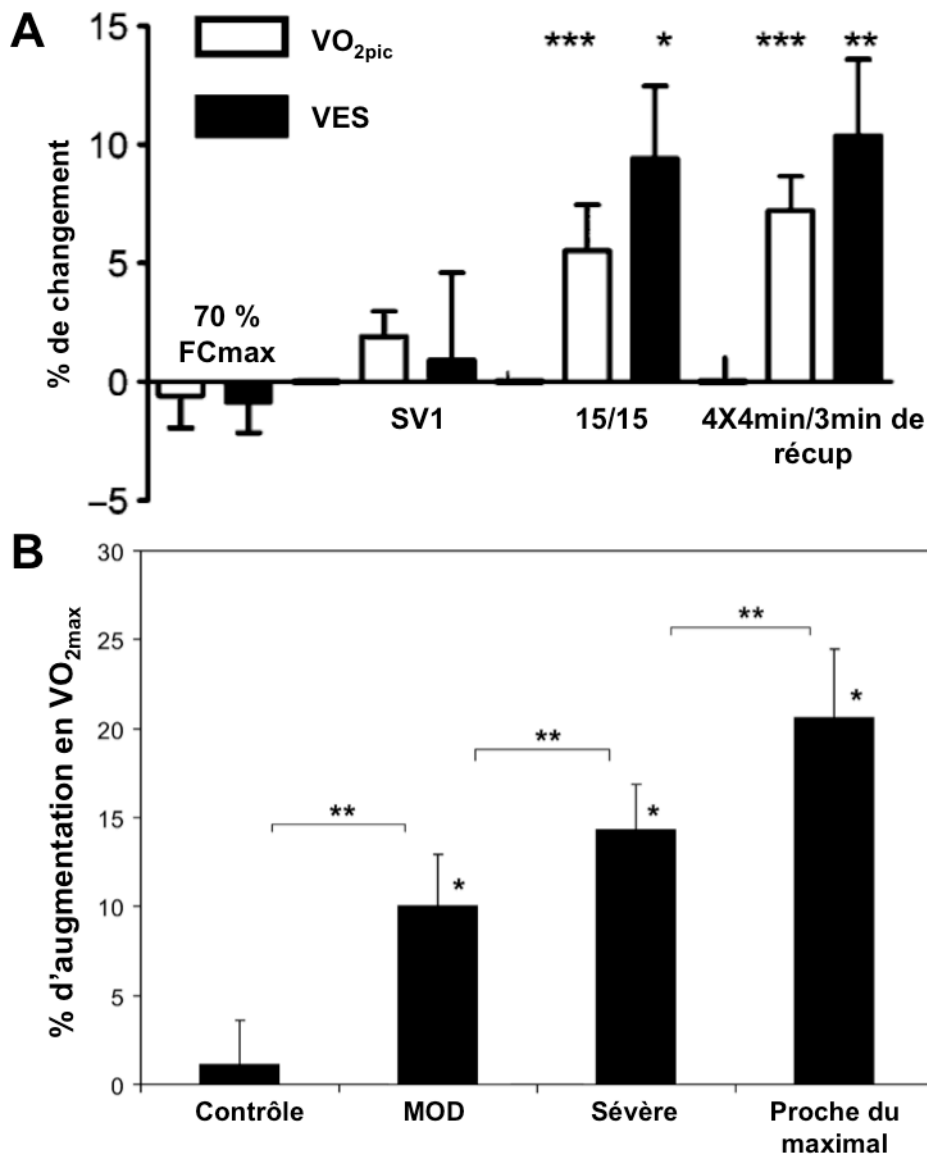
**Figure 3.10 :** Exemples de protocoles d'entraînement aérobie. Les barres bleues représentent les phases de travail et les barres grises présentent les phases de récupération. Le protocole (A) montre une séance HIT de type 30 s/30 s (30 s de travail et 30 s de récupération active = HIT « intervalles courts »). La récupération peut également être passive. Le protocole (B) montre une séance HIT de type « sprint interval training » ou « all-out ». Il s'agit ici de réaliser 30 s de travail à puissance maximale et 4 min de récupération active. Le protocole (C) représente une séance HIT de type « intervalles longs » où les phases de travail durent 3-4 min séparées par 3-4 min de récupération active. C'est ce mode de HIT que nous avons utilisé dans l'étude n°3. Le protocole (D) représente une séance traditionnelle d'entraînement aérobie (ou MOD) où l'intensité est modérée et l'exercice n'est pas entrecoupé de phases de récupération [adaptée de (Boyne *et al.*, 2013)]. N/A : information non-disponible.

### 3.3 Influence des HIT sur les adaptations physiologiques

#### 3.3.1 Adaptations physiologiques majeures chez le sujet sain

Une plus haute intensité est associée à une progression importante du  $VO_{2max}$ , des seuils ventilatoires, du volume d'éjection systolique et de la performance d'endurance que ce soit chez le sujet sportif ou le sujet âgé (**Figure 3.11**) (Helgerud *et al.*, 2007). Pour renforcer cela, il est montré que l'intensité d'exercice est corrélée avec le  $VO_{2pic/max}$  (**Figure 3.11**). Par ailleurs, il a été démontré chez des athlètes que ce type d'entraînement peut améliorer la capacité des systèmes tampons musculaires seulement après 3 semaines de HIT (Weston *et al.*, 1997). De plus, les HIT optimisent en parallèle l'activité des enzymes glycolytiques et oxydatives contrairement aux exercices sous-maximaux (uniquement oxydatives). Ainsi, les HIT induisent des effets bénéfiques sur le métabolisme aérobie et anaérobie (Laursen & Jenkins, 2002).

Bien que la durée d'implication soit considérablement moins élevée et que le volume total d'exercice soit largement inférieur (respectivement 67 % et 90 % inférieurs après les HIT qu'après les MOD), les adaptations physiologiques sont plus rapides suite aux HIT comparé aux MOD (Rakobowchuk *et al.*, 2005; Gibala *et al.*, 2006, 2012; Burgomaster *et al.*, 2008; Gibala & McGee, 2008; Sun *et al.*, 2014). Par exemple, Laursen & Jenkins (2002) ont montré qu'après seulement 4 séances de HIT chez des cyclistes de haut niveau, le SV1 est repoussé à des intensités plus élevées (+ 22 %), la puissance maximale est augmentée et la fréquence cardiaque est diminuée pour une intensité donnée (meilleur rendement énergétique) (Laursen & Jenkins, 2002). Ce paramètre temporel est d'une importance capitale pour les bénéfices que les patients peuvent retirer d'un tel travail où le maximum d'améliorations physiologiques et neurophysiologiques doivent se mettre en place dans la fenêtre de plasticité (3-4 premiers mois chez le patient et 2-3 semaines chez le rongeur) afin d'amplifier la qualité de la récupération (Murphy & Corbett, 2009).



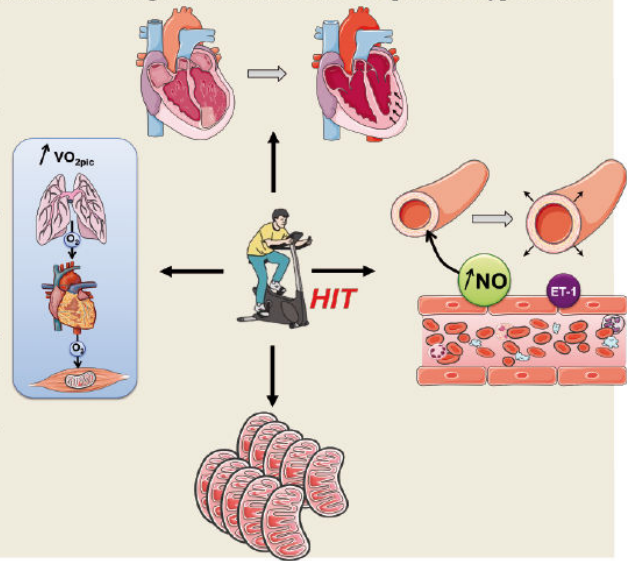
**Figure 3.11** : Effet de différents types d'entraînement d'endurance chez le sujet sain sur la fonction cardiovasculaire et métabolique. (A) Le premier entraînement est un MOD dont l'intensité est fixée à 70 % de la FC max ; l'intensité du 2<sup>ème</sup> entraînement est fixée autour du SV1 (MOD également) ; le 3<sup>ème</sup> exercice est basé sur une haute intensité court caractérisé par 15 s d'effort et 15 s de récupération (15/15) (HIT) et le dernier est un HIT long caractérisé par 4 min d'effort séparé par 3 min de récupération (4x4 min/3 min récup). On peut observer les HIT induisent une amélioration de ses fonctions physiologiques supérieures aux programmes MOD [adaptée de (Helgerud et al., 2007)]. (B) Le 2<sup>ème</sup> schéma illustre l'effet de l'intensité de l'entraînement sur l'amélioration de VO<sub>2max</sub>. MOD : exercice modéré continu; HIT : high intensity interval training; SV1 : seul ventilatoire 1.

Par ailleurs, de hautes intensités d'exercice conduisent à des améliorations supérieures de l'aptitude aérobie et des paramètres cardiovasculaires comparé à des intensités modérées chez les sujets présentant des maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle ou maladies cardiaques) (Encadré 3.3) (Rognmo et al., 2004; Rakobowchuk et al., 2005; Gibala et al.,

2006, 2012; Wisløff *et al.*, 2007; Burgomaster *et al.*, 2008; Gibala & McGee, 2008; Moholdt *et al.*, 2009, 2014; Ciolac, 2012; Sun *et al.*, 2014; Weston *et al.*, 2014). Encore une fois, il est utile de préciser que ces adaptations bénéfiques sont observées alors même que le temps d'implication est bien plus bas que celui des exercices aérobies traditionnels, sans pour autant augmenter le risque de complications (Meyer *et al.*, 2013; Weston *et al.*, 2014, 2016). Ainsi, de plus en plus de preuves indiquent qu'il est possible d'obtenir des améliorations significativement plus importantes à partir d'exercices basés sur des intensités plus élevées.

### Encadré 3.3 | Effets des HIT sur les personnes présentant des troubles cardiovasculaires

Plusieurs auteurs ont démontré que les HIT sont plus efficaces que les MOD pour améliorer la qualité de vie et la fonction cardiovasculaire des patients hypertendus ou ayant d'autres troubles cardiovasculaires (Ciolac *et al.*, 2012 ; Moholdt *et al.*, 2013 ; Moholdt *et al.*, 2009 ; Weston *et al.*, 2013 ; Wisloff *et al.*, 2007 ; Rognum *et al.*, 2004). En effet, les HIT induisent 1) une augmentation plus importante du VO<sub>2</sub>pic après un entraînement MOD (36 % vs. 16 % respectivement), 2) une amélioration de la fonction endothéliale *via* l'augmentation de libération de NO associée à un niveau plasmatique plus élevé en NO et plus faible d'ET-1, 3) une réduction du niveau de norépinephrine dans des conditions de repos, pendant et juste après l'exercice et 4) une diminution de la rigidité artérielle chez les patients hypertendus (Ciolac *et al.*, 2011). De même, les HIT favorisent une augmentation supérieure du VO<sub>2</sub>pic chez les patients insuffisants cardiaques que tous les autres types d'activité physique (Guiraud *et al.*, 2012 ; Smart, 2013). De plus, la fonction endothéliale et la morphologie du ventricule gauche sont davantage améliorées qu'avec les MOD, comme indiqué par une baisse de la pression artérielle systolique et diastolique (Moholdt *et al.*, 2009 ; Wisloff *et al.*, 2007). La biogénèse mitochondriale et le taux de recapture maximal de Ca<sup>2+</sup> dans le réticulum sarcoplasmique du muscle cardiaque sont également plus élevés après un programme de 12 semaines de HIT (Wisloff *et al.*, 2007). Les HIT augmentent aussi la tolérance à l'acidose de manière plus importante que les MOD car les patients avec des troubles cardiaques suivant un programme HIT réalisent un temps limite plus élevé à 90 % de la VO<sub>2</sub>pic que ceux suivant le programme MOD (Warburton *et al.*, 2005).



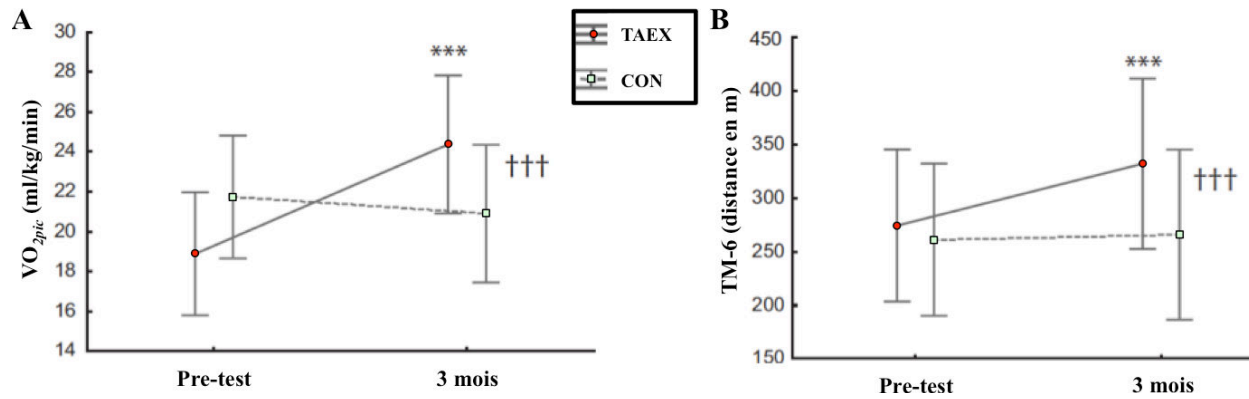
### 3.3.2 Effets bénéfiques controversés des HIT post-ischémie cérébrale

**Sur le plan physiologique.** Malgré les preuves apportées par les travaux cités ci-dessus, très peu d'études se sont concentrées sur les adaptations physiologiques induites par les HIT après un AVC. Ces études montrent que les HIT pourraient induire des modifications



similaires et/ou supérieures sur l'aptitude aérobie chez les patients AVC que celles induites par les entraînements MOD. Néanmoins, des controverses subsistent.

Katz-Leurer *et al.* (2003) ont constaté que 2 semaines de HIT suivies de 6 semaines d'exercices MOD, ont des effets bénéfiques sur la FC de repos, la charge de travail, le temps de travail et sur la capacité à monter des escaliers (Katz-Leurer *et al.*, 2003). Cependant, bien que considérée comme intense par les auteurs, l'intensité est limitée à 60 % de la FC de repos. En physiologie de l'exercice, cette intensité d'exercice relative est majoritairement considérée comme modérée. Nous verrons donc plus dans les prochains paragraphes l'importance de la méthode utilisée pour déterminer les intensités d'exercice. Comme mentionné plus haut, les patients dont la sévérité de l'AVC est faible ou modérée sont capables de tolérer des exercices de hautes intensités relatives (*i.e.* en %) (Globas *et al.*, 2012). Ainsi les auteurs ont récemment appliqué de plus hautes intensités dans leur programme d'endurance en utilisant les HIT. Ils ont montré des gains encourageants du  $VO_{2pic}$  et de l'économie de travail associés à une meilleure qualité de vie (Gjellesvik *et al.*, 2012; Boyne *et al.*, 2013; Matlage *et al.*, 2013). Dans une étude, les patients AVC ont réalisé des HIT sur tapis roulant (4 x 4 minutes de travail à une intensité de 85-95 % de la fréquence cardiaque pic, séparées par 3 minutes de récupération active) durant 4 semaines (5 jours par semaines) (Gjellesvik *et al.*, 2012). Une augmentation du  $VO_{2pic}$  (+ 11,6 %) et de la ventilation pulmonaire pic a été observée comparé aux valeurs de base (**Figure 3.12**). De manière intéressante, l'augmentation du  $VO_{2pic}$  est similaire à ce qu'il est observé dans d'autres études après 6 mois d'entraînement basés sur des exercices aérobies d'intensité faible à modérée (MOD) (Macko *et al.*, 2005). Une telle augmentation du  $VO_{2pic}$  est considérée comme remarquable suite à cette courte intervention basée sur les HIT (Gjellesvik *et al.*, 2012).



**Figure 3.12 : Effet des HIT chez le patient AVC sur (A) la  $VO_{2pic}$  et le TM-6 (B).** HIT : 4 x 4 minutes de travail à une intensité de 85-95 % de la fréquence cardiaque pic, séparées par 3 minutes de récupération active durant 4 semaines (5 jours par semaines). Nous pouvons constater que le TAEX est plus efficace pour engendrer des effets sur le  $VO_{2pic}$  et la capacité de marche que la rééducation classique. Cette dernière n'induit pas d'effets observables sur les mesures présentées [adaptée de (Gjellesvik *et al.*, 2012)]. TAEX = aerobic treadmill training ; CON = conventional training (pas de travail d'endurance mais de la physiothérapie) ; TM-6 : test de marche de 6 minutes

Par ailleurs, une amélioration de l'économie de course est également observée, illustrée par de plus basses valeurs du  $VO_2$ , de la FC et de la ventilation pulmonaire durant la marche à une même intensité sous-maximale après le programme HIT (Gjellesvik *et al.*, 2012). La réduction de l'effort réalisé durant la marche post-entraînement montre que les HIT peuvent avoir une forte implication dans la diminution de la dépense énergétique dans les tâches de la vie quotidienne. Cependant, ces résultats ne sont pas en accord avec les travaux d'Askim *et al.* (2014) dans lesquels aucune augmentation significative du  $VO_{2pic}$  n'est rapportée alors qu'ils utilisent les mêmes caractéristiques que l'étude précédente pour définir leur programme HIT durant 6 semaines (Askim *et al.*, 2014). Ils ont attribué ce résultat à un échantillon trop petit et/ou aux trop peu de sessions d'entraînement. Finalement, une seule étude a récemment comparé l'entraînement HIT et MOD où aucune différence significative entre ces deux intensités est observée à cause d'un trop petit échantillon (Boyne *et al.*, 2016).

D'autres aspects supposent que les HIT pourraient avoir un intérêt majeur dans la rééducation post-AVC. D'un point de vue clinique, la rééducation est multiple et conséquente pour le patient AVC. À ce jour, le manque de temps est un des critères majeurs limitant l'implication des patients lors des programmes recommandés (MOD). Les HIT permettraient

d'optimiser la rééducation tout en allégeant l'emploi du temps du patient puisque la durée d'implication du sujet est moins élevée que le MOD. Les HIT semblent également perçus comme plus appréciables que les MOD car les exercices durent moins longtemps et sont moins monotones (Bartlett *et al.*, 2011).

Les hautes intensités d'exercice sont également connues pour solliciter (et optimiser) le métabolisme anaérobie car l'intensité est toujours supérieure au SV1 contrairement aux exercices de faible intensité où l'intensité est fréquemment fixée sous le SV1. L'utilisation des HIT est donc une approche très différente pour améliorer le  $VO_{2pic}$  (Buchheit & Laursen, 2013). Rappelons que les adaptations induites par les HIT sont rapides. Ainsi, cela pourrait d'une part prévenir efficacement l'apparition du déconditionnement physique, et d'autre part, amplifier les effets bénéfiques sur la neuroplasticité en agissant dans la période la plus favorable à la récupération, c'est-à-dire dans la fenêtre de plasticité correspondante aux premières semaines/mois post-AVC (**Encadré 3.4**) (Ward, 2005; Murphy & Corbett, 2009; Schmidt *et al.*, 2014; Pin-Barre & Laurin, 2015; Svensson *et al.*, 2015). Cependant, l'étude des effets de l'entraînement intense sur la récupération fonctionnelle (incluant les performances d'endurance) couplée à la neuroplasticité post-ischémie cérébrale ne peut être réalisée que sur le modèle animal ce qui paraît indispensable pour renforcer l'intérêt d'utiliser une telle stratégie.

**Encadré 3.4 | Quand faut-il débiter l'entraînement post-AVC ?**

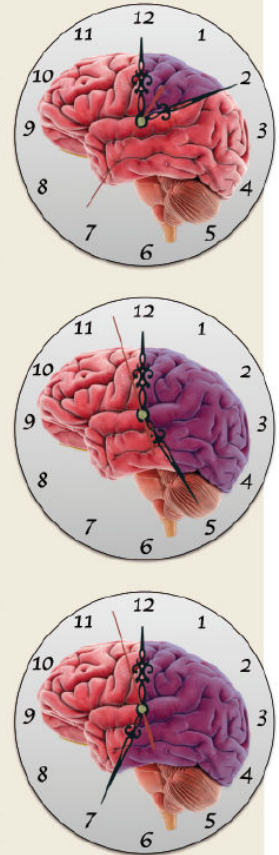
La période d'initiation de la rééducation fonctionnelle post-AVC semble être un facteur déterminant pour la récupération (Cifu *et al.*, 1999 ; Da Cunha *et al.*, 2002 ; Maulden *et al.*, 2005 ; Paolucci *et al.*, 2000). Même si la période optimale reste controversée, la tendance semble plutôt indiquer qu'initier la rééducation dans les premiers jours suivant l'AVC paraît être le choix le plus approprié, mais les preuves de l'efficacité d'une intervention précoce sont encore manquantes.

Chez l'Humain, certains auteurs suggèrent qu'une rééducation précoce (durant la première semaine post-AVC, ce qui n'inclut pas forcément l'exercice aérobie mais des exercices de mobilisation articulaire) peut raccourcir la période d'hospitalisation, améliorer la récupération fonctionnelle et peuvent prévenir des complications liées à l'inactivité prolongée (*i.e.* période de déconditionnement) tout en présentant un faible risque d'effets délétères (Cifu *et al.*, 1999 ; Da Cunha *et al.*, 2002 ; Maulden *et al.*, 2005 ; Musicco *et al.*, 2003). Au contraire, une intervention tardive est associée avec une plus faible récupération fonctionnelle et une plus longue période de rééducation (Da Cunha *et al.*, 2002 ; Maulden *et al.*, 2005).

L'expérimentation sur le rongeur a renforcé cette hypothèse en montrant que débiter l'entraînement en endurance précocement (entre 1 et 5 jours post-ischémique) est plus efficace pour améliorer la performance motrice, réduire le volume lésionnel, augmenter la perfusion sanguine dans la région ischémique et favoriser la neuroplasticité comparé à l'exercice plus tardif (Bland *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2014 ; Park *et al.*, 2010 ; Matsuda *et al.*, 2011; Mizutani *et al.*, 2010 ; Yang *et al.*, 2003). Aucune de ces études n'a montré une aggravation du volume lésionnel et/ou de l'œdème cérébrale (Matsuda *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013).

Cependant, débiter l'entraînement dans les premières 24 heures post-ischémie cérébrale peut aggraver le volume lésionnel, le taux de mort cellulaire ainsi que les déficits sensorimoteurs sur le long terme (Bland *et al.*, 2000; DeBow *et al.*, 2004; Kozłowski *et al.*, 1996; Risedal *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2014). Par exemple, une utilisation abusive et trop précoce de la patte antérieure parétique peut augmenter la perte de tissus autour de la lésion et aggraver les déficits sensorimoteurs sur du long terme (Svensson *et al.*, 2015 ; Risedal *et al.*, 1999). Les causes à l'origine de ces résultats peuvent être multiples. Les principales hypothèses sont d'une part, que l'exercice physique induit une hyperthermie localisée et prolongée pouvant potentialiser les dommages cellulaires induits par l'ischémie cérébrale. D'autre part, l'exercice physique précoce peut accentuer l'excitotoxicité observée dans la zone cérébrale à proximité de l'infarctus durant les premières heures post-ischémiques (Risedal *et al.*, 1999 ; Humm *et al.*, 1999). De même, les effets néfastes de l'entraînement (trop) précoce sont aussi observés sur différents mécanismes de la neuroplasticité (Pio *et al.*, 2013). Une dérégulation de l'expression de plusieurs protéines impliquées dans la plasticité synaptique ainsi qu'une baisse du taux de cytokines anti-inflammatoires, liées à la neuroprotection, sont observées (Griesbach *et al.*, 2004 ; McAlees *et al.*, 2011 ; Zhao *et al.*, 2012).

La période la plus appropriée pour débiter l'entraînement devrait nécessairement correspondre à la période critique ou « fenêtre de plasticité » pour maximiser les effets de l'entraînement. La fenêtre de plasticité fait référence à la période durant laquelle le SNC, en réponse à un traumatisme, produit abondamment des facteurs de modifications moléculaires et cellulaires stimulant les mécanismes de réparation/compensation dans les différentes régions cérébrales pouvant favoriser la récupération fonctionnelle (Ward, 2005).



**Sur les mécanismes de neuroplasticité.** Bien que l'intensité d'exercice soit un paramètre crucial dans l'amélioration de l'aptitude aérobie, l'efficacité des hautes intensités sur la neuroplasticité reste encore sujette à controverses dans les études chez le rongeur. Très peu de travaux ont étudié l'effet de la haute intensité d'exercice sur la neuroplasticité chez l'animal sain et aucune à notre connaissance après une ischémie cérébrale. Une étude montre chez le rat sain que l'entraînement d'endurance basé sur de hautes intensités (95-100 % du  $VO_{2max}$ ) permet d'induire de plus hautes concentrations de BDNF et de GDNF au niveau

cérébral comparé à un entraînement MOD (80 % du  $VO_{2max}$ ) (Afzalpour *et al.*, 2015). À l'inverse, Nokia *et al.* (2016) ont montré qu'une haute intensité ne présente qu'un effet très modéré (non significatif) sur la neurogenèse au niveau de l'hippocampe malgré une amélioration de la capacité de course des animaux (Nokia *et al.*, 2016). Une étude sur la souris âgée a confirmé que la neurogenèse ne semble pas favorisée suite à 8 semaines d'exercice d'endurance dont l'intensité est fixée au-delà du seuil lactique (intensité considérée comme élevée, *cf. Section 4*) (E *et al.*, 2014). Cependant, cette étude indique également que ce type d'exercice modifie divers paramètres impliqués dans l'activité bioénergétique cérébrale et notamment dans la biogenèse mitochondriale. En effet, les auteurs observent une augmentation de PGC-1 $\alpha$  et de l'ARNm de la citrate synthase (*i.e.* enzyme du cycle de Krebs) suggérant une augmentation de l'activité aérobie dans ces cellules nerveuses.

#### 4. Considérations méthodologiques des programmes d'endurance

Outre le fait que les paramètres d'exercice actuellement recommandés (intensité modérée) peuvent potentiellement expliquer l'efficacité limitée des améliorations fonctionnelles suite à l'entraînement d'endurance post-AVC, plusieurs limites méthodologiques communément observées chez le patient AVC et chez l'animal sont à prendre en compte dans l'interprétation de ces résultats. Ces limitations méthodologiques conduisent d'une part à masquer potentiellement l'impact réel de l'entraînement (en fonction des différentes mesures expérimentales), et d'autre part, à augmenter la variabilité inter-étude pouvant expliquer les controverses décrites précédemment. Ces limites seront considérées dans l'étude n°3.

#### ***4.1 Harmonisation de la charge de travail entre les groupes d'étude***

Il est communément considéré que la dépense énergétique totale engendrée par chaque type d'exercice doit être équivalente afin de pouvoir comparer spécifiquement les effets de chaque paramètre d'entraînement sur les variables expérimentales (Rognmo *et al.*, 2004; Wisløff *et al.*, 2007). L'harmonisation de la charge de travail est fréquemment observée dans les études de physiologie de l'exercice ce qui n'est pas le cas dans les études cliniques ou précliniques sur l'AVC lorsque différents niveaux d'intensité sont comparés (Boyne *et al.*, 2016). Il n'est donc pas certain que ce soit bien l'effet d'un paramètre en particulier qui agisse sur les variables mesurées s'il n'y a pas d'harmonisation de la charge de travail.

#### ***4.2 Évaluation de l'aptitude aérobie : Limites de l'utilisation des paramètres maximaux comme $VO_{2pic}$ , $FC_{max}$ et la vitesse maximale atteinte ( $V_{max}$ )***

La mesure des paramètres physiologiques maximaux présente 2 limites importantes concernant l'évaluation de l'aptitude aérobie et la détermination des intensités d'exercice.

***Évaluation de l'aptitude aérobie.*** Chez l'humain,  $VO_{2max}$  reste le paramètre le plus étudié dans les études sur l'AVC (et autres pathologies) suite à un entraînement car l'améliorer reste une des priorités des cliniciens (Marsden *et al.*, 2013). Cependant, même si le  $VO_{2max}$  est un critère de qualité de vie reconnu, il n'est pas suffisant pour évaluer l'aptitude aérobie des sujets pour plusieurs raisons (Bosquet *et al.*, 2002; Midgley *et al.*, 2007). Il est maintenant admis que le  $VO_{2max}$  est un faible prédicteur de la performance chez des coureurs bien entraînés (Faude *et al.*, 2009). Par exemple, deux coureurs avec le même  $VO_{2max}$  ne réalisent pas forcément la même performance, au même titre qu'un même coureur ayant un  $VO_{2max}$  similaire sur plusieurs années, peut voir sa performance s'améliorer (Conley & Krahenbuhl, 1980; Lacour *et al.*, 1990; Horowitz *et al.*, 1994; Jones, 2006). Dans le cadre de

l'AVC, les patients n'atteignent jamais (ou très rarement ce qui est discutable) leur « vrai »  $VO_{2max}$  (d'où  $VO_{2pic}$ ) puisque leurs troubles sensorimoteurs ne leur permettent pas d'exploiter leur capacité aérobie maximale (Tang *et al.*, 2006). De plus, il est possible d'observer après un entraînement aérobie chez le patient AVC, une amélioration des performances aux tests fonctionnels (TM-6 et TM-10) sans progression du  $VO_{2pic}$  alors que ces tests reflètent indirectement une augmentation de l'aptitude aérobie (Duncan *et al.*, 2003).

Chez l'animal, les paramètres physiologiques maximaux sont à notre connaissance très rarement mesurés chez le rat après une ischémie cérébrale. Le  $VO_{2pic}$  est utilisé dans quelques études portant sur l'infarctus du myocarde ou l'hypertension et semble inévitablement présenter les mêmes inconvénients que chez l'humain. D'autres auteurs se réfèrent à la vitesse maximale atteinte ( $V_{max}$ ) qui, comme le  $VO_{2pic}$ , peut varier entre les animaux sans jamais s'assurer que cela soit une « vraie » valeur reflétant les capacités physiologiques maximales (Thomas *et al.*, 2007). De plus, une fois le  $VO_{2pic}$  atteint, la  $V_{max}$  est dépendante de l'économie de course, de la capacité du métabolisme anaérobie et de la motivation (Høydal *et al.*, 2007). Néanmoins, la  $V_{max}$  n'est pas à négliger pour refléter les capacités maximales de l'animal lors d'une épreuve d'effort (Høydal *et al.*, 2007).

**Détermination des intensités de travail.** L'utilisation des paramètres maximaux est aussi discutable, parmi d'autres paramètres, quant à son utilisation pour déterminer les zones d'intensités d'un exercice. Dans les programmes aérobie, les intensités d'exercice (modérée ou intense) sont généralement exprimées en pourcentage des paramètres physiologiques maximaux relevés lors d'un test d'effort incrémental (% du  $VO_{2pic}$ , % de la  $FC_{pic}$ , % de la puissance/vitesse maximales atteintes) (Rognmo *et al.*, 2004; Wisløff *et al.*, 2007; Marsden *et al.*, 2013). L'intensité d'exercice est parfois même déterminée de manière subjective tel que l'effort maximal tolérable par les sujets (e.g. en s'appuyant sur l'échelle de Borg). Étant

donné que l'intensité d'exercice est un paramètre crucial, il doit être scrupuleusement défini physiologiquement afin de mieux comprendre les différentes répercussions du programme choisi (*e.g.* HIT vs. MOD). Cependant, l'utilisation des paramètres physiologiques maximaux comme référence pour déterminer les intensités chez les patients AVC n'est pas toujours un indicateur pertinent puisque, comme énoncé plus haut, ces derniers n'atteignent pas leurs capacités aérobies maximales (Marzolini *et al.*, 2012). Ainsi l'intensité d'exercice, basée sur les paramètres physiologiques maximaux, est sous-estimée dans la plupart des cas et les différentes zones d'intensités ne peuvent pas être distinguées précisément (Bosch *et al.*, 2015). En effet, lorsque les intensités sont fixées à 75 % de  $VO_{2pic}$ , certains sujets (sains) travaillent en dessous du SV1 alors que d'autres sont au-dessus (*e.g.* de 86 à 118 % du SV1 individuel) (Mann *et al.*, 2013). Ainsi, l'utilisation des paramètres maximaux comme référence va amener une variation des concentrations sanguines de lactate très importante car lors d'un exercice rectangulaire dont l'intensité est fixée à 60 % de  $VO_{2pic}$ , la concentration de lactate va varier de 0,7 à 5,6 mmol/l selon les sujets sains. Dans cette même étude, si l'intensité est fixée à 75 % de  $VO_{2pic}$ , les concentrations vont aller de 2,2 à 8.0 mmol/l (Scharhag-Rosenberger *et al.*, 2010). La réponse physiologique est donc très hétérogène dans ces conditions.

Chez l'animal, les intensités sont classiquement déterminées de manière empirique (*i.e.* à partir d'intensités non-basées sur des paramètres physiologiques) (Wang *et al.*, 2005; Ke *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013d). Bien que cela ne soit pas recommandé, les vitesses sont déterminées en fonction d'une charge absolue (c'est-à-dire, une vitesse fixée à 16 m/min ou 20 m/min par exemple). Cette méthode induit des réponses physiologiques très variables d'un individu à l'autre. Il est donc difficile de distinguer précisément/physiologiquement les zones d'intensité d'exercice et d'individualiser les programmes (Pang *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*,



2014). Les conséquences sont qu'une intensité considérée comme modérée par un groupe de chercheurs peut être considérée comme intense pour un autre groupe de chercheur. Par exemple, certaines études considèrent qu'une vitesse fixée à 10 ou 13 m/min est intense pour des rats MCAO-r alors que d'autres estiment qu'une vitesse de 20 m/min est une vitesse utilisée lors de HIT (Choe *et al.*, 2006; Matsuda *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013d; Holloway *et al.*, 2015). Les auteurs qui se réfèrent à la  $V_{max}$  ne peuvent pas garantir des conditions physiologiques similaires dans un groupe d'animaux car la  $V_{max}$  peut varier considérablement d'un animal à l'autre (Thomas *et al.*, 2007). Une étude indique que la distance parcourue après l'atteinte du  $VO_{2pic}$  peut varier de 30 à 40 % d'une souris à l'autre (de même espèce) (Billat, 2005). Ainsi, définir les intensités d'exercice en fonction des paramètres maximaux ne semble donc pas être l'option la plus appropriée.

Par ailleurs, le terme « intensité » est lui-même source de confusion. Chez l'animal, une étude a pour objectif de comparer l'effet de différentes intensités sur la récupération motrice chez le rat ayant subi une MCAO-r de 90 min (Li *et al.*, 2013). Cependant, la vitesse du tapis roulant est la même pour les 2 groupes (25 m/min). La différence entre les 2 types d'entraînement est liée au fait que le groupe « entraînement intense » réalise les séances sans récupération alors que le groupe dit « intensité modérée » réalise des séries de 15 min avec 5 min de récupération entre les séries. Non seulement la charge de travail n'est pas la même entre les 2 groupes mais le paramètre qui varie est surtout la durée de travail, et non l'intensité. Ces auteurs ont montré que l'intensité « modérée » est plus efficace sur la récupération motrice (analyse EMG) que l'entraînement « intense ».

L'ensemble de ces résultats, obtenus à partir de protocoles d'entraînement très différents, renforce les controverses énoncées plus haut au sujet des effets bénéfiques de l'entraînement de haute intensité sur la neuroplasticité et la récupération fonctionnelle. Ces méthodes sont en effet davantage source de biais dans l'interprétation des résultats. Il paraît

donc nécessaire de déterminer les intensités d'entraînement à partir de repères physiologiques plus fiables.

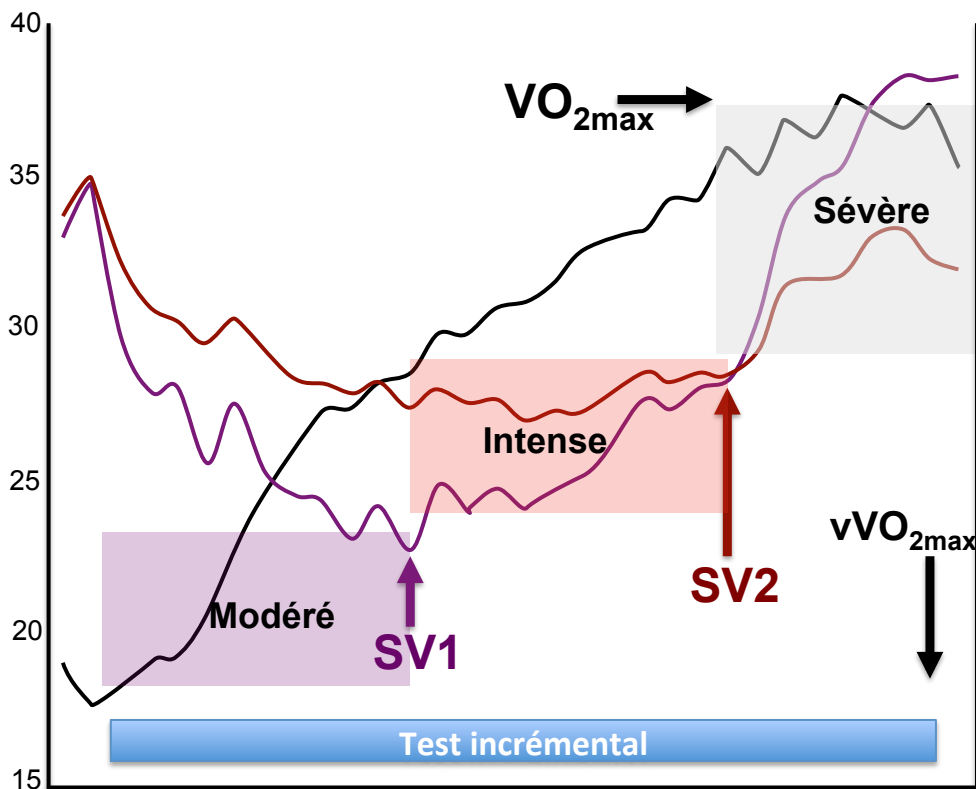
### *4.3 Intérêt des paramètres physiologiques sous-maximaux pour évaluer l'aptitude aérobie et déterminer les intensités d'exercice*

L'utilisation des paramètres physiologiques sous-maximaux représente une alternative prometteuse pour mesurer l'aptitude aérobie et déterminer les zones d'intensité de l'exercice. En effet, le SV1 est discernable dans 66 % des patients AVC sans difficulté majeure par les patients alors que le  $VO_{2max}$  est considéré comme atteint dans seulement 18 % des cas lors du test incrémental (Tomczak *et al.*, 2008; Marzolini *et al.*, 2012). Le SV1 est obtenu à une intensité d'effort considérée comme modérée pour le sujet sain et pathologique. Ainsi, ce paramètre est peu dépendant de la motivation du sujet ce qui paraît donc plus pertinent scientifiquement pour déterminer les intensités d'exercice (Bosquet *et al.*, 2002; Faude *et al.*, 2009; Marzolini *et al.*, 2012; Bosch *et al.*, 2015). Par ailleurs, il est suggéré que l'entraînement basé sur les SV produirait moins de variabilité interindividuelle dans les effets de l'entraînement par rapport à la méthode du %  $VO_{2pic}$ . Cependant, cela reste encore une hypothèse (Mann *et al.*, 2013).

L'intensité d'un effort peut être découpé en 3 zones à partir de l'intensité correspondante aux SV1 et SV2 (**Figure 3.13**) (Whipp, 1987; Gaesser & Poole, 1996):

- Intensité modérée : < à SV1
- Intense : entre SV1 et SV2
- Sévère : > à SV2

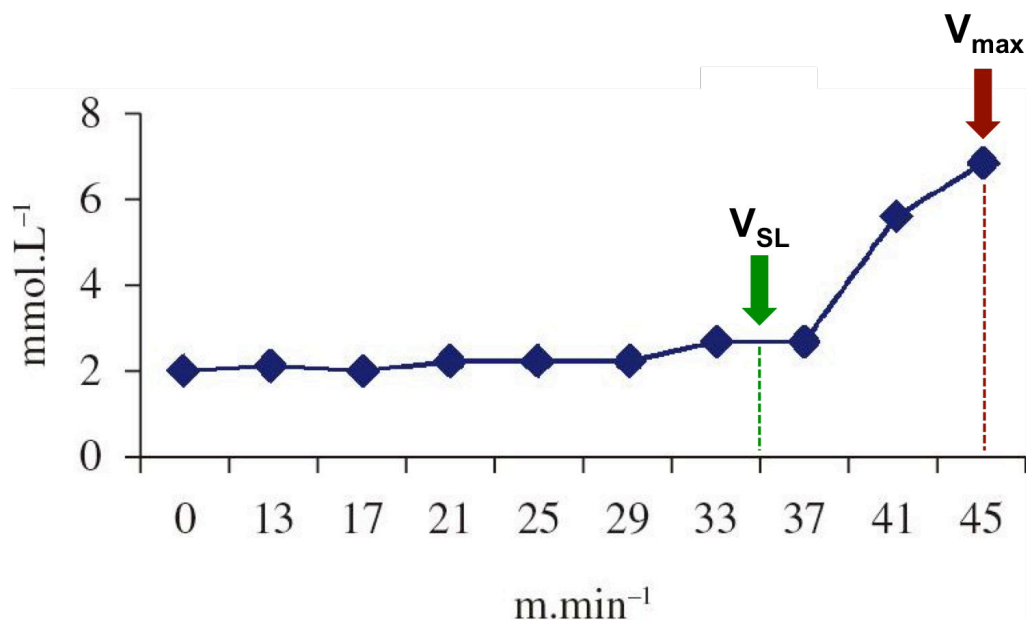
L'analyse du SV1 permet donc de fournir un repère physiologique précis pour fixer des intensités d'exercice relatives à chaque sujet. De plus, l'intensité correspondante à SV1 est davantage révélatrice de l'aptitude aérobie que  $VO_{2pic}$ .



**Figure 3.13 :** Détermination des 3 zones d'intensité en fonction des SV1 et SV2 lors d'un test d'effort incrémental à intensité croissante et maximale. Ici sont représentés les courbes des équivalents respiratoires<sup>1</sup>:  $VE/VO_2$  (en violet) et  $VE/VCO_2$  (en rouge). La courbe noire représente l'évolution de  $VO_{2max}$  sur un sujet sain. VE : ventilation minute ;  $vVO_{2max}$  : vitesse atteinte à  $VO_{2max}$ .

<sup>1</sup> Ces ratios permettent d'identifier les SV.

Chez l'animal, il est également possible de se référer à des paramètres physiologiques sous-maximaux. La courbe d'évolution du lactate obtenue au cours d'un test d'effort incrémental sur tapis roulant paraît intéressante car celle-ci permet de déterminer la vitesse à laquelle est atteint le seuil lactique (SL). L'intensité/vitesse associée au SL ( $V_{SL}$ ) correspond à l'intensité maximale où la consommation et la production de lactate par les cellules musculaires restent équilibrées au cours d'une épreuve d'effort. Mais au-delà de cette limite, la lactatémie augmente de manière disproportionnée par rapport à l'intensité de l'exercice (Meyer *et al.*, 2005). La  $V_{SL}$  est observée à des vitesses similaires au SV1 bien que les mécanismes physiologiques diffèrent (Meyer *et al.*, 2005; Hopker *et al.*, 2011). La courbe d'évolution du lactate permet également de déterminer les concentrations sanguines maximales de lactate correspondantes à la vitesse maximale atteinte ( $V_{max}$ ) (Figure 3.14). Ce paramètre est également considéré comme plus pertinent pour évaluer l'aptitude aérobie pour les mêmes raisons que chez l'humain (Faude *et al.*, 2009).



**Figure 3.14 :** Exemple d'une courbe de lactate obtenue au cours d'un test d'effort incrémental. La  $V_{SL}$  correspond à la vitesse atteinte au seuil lactique alors que la  $V_{max}$  correspond à la vitesse maximale atteinte à la fin du test [adaptée de (Brito Vieira *et al.*, 2014)].

En considérant l'ensemble des points évoqués ci-dessus, l'intensité optimale n'est pas encore clairement établie car aucune preuve n'indique que les hautes intensités de travail

pourraient réduire davantage la neuroinflammation et/ou stimuler la neuroplasticité ainsi qu'améliorer les performances d'endurance (et les paramètres physiologiques associés) que les exercices plus modérés témoignant de l'efficacité d'un traitement, suite à une ischémie cérébrale. Ceci pourrait être partiellement lié aux limites méthodologiques concernant la détermination de l'intensité et l'évaluation de l'aptitude aérobie. Ces considérations seront prises en compte dans l'étude présentée ci-dessous car l'intensité de course sera déterminée à partir du SL, paramètre physiologique plus pertinent pour distinguer les basses des hautes intensités. Ce paramètre, associé à la  $V_{max}$ , permettrait de mieux évaluer les répercussions de l'entraînement sur les capacités aérobies et fonctionnelles ainsi que sur la neuroplasticité après une ischémie cérébrale. Concernant la neuroplasticité, nous avons vu que la plasticité cérébrale est fortement dépendante de l'activité microgliale qui joue un rôle prépondérant dans l'expression des neurotrophines. Ces dernières vont agir, entre autres, sur la plasticité synaptique. Dans l'étude n°3, nous avons mesuré des marqueurs spécifiques de ces mécanismes interdépendants de neuroplasticité post-ischémique qui n'ont pas été abordés à ce jour suite à différents programmes d'endurance. Pour cela, la forme de la microglie réactive est évaluée ainsi que le récepteur à neurotrophine, le  $p75^{NTR}$ . Comme toute modification de ces marqueurs est connue pour agir sur l'activité GABAergique, l'expression des co-transporteurs du  $Cl^-$  est également abordée. Ces marqueurs pourront indiquer si le rôle de l'intensité de l'exercice favorise un environnement bénéfique à la survie cellulaire et à la plasticité adaptative post-ischémique.

## 5. Étude n°3

### **Comparaison des effets d'un entraînement de type fractionné de haute intensité avec un entraînement prolongé continu sur la neuroplasticité et la récupération fonctionnelle chez le rat**

#### ***5.1 Objectif de l'étude n°3***

L'objectif de l'étude est d'évaluer spécifiquement l'influence de l'intensité d'exercice sur la récupération post-ischémie cérébrale en se focalisant sur les paramètres fonctionnels, métaboliques et cellulaires. Pour cela, les effets d'un programme HIT sont comparés avec ceux d'un programme MOD au cours des 2 premières semaines suivant l'ischémie cérébrale chez le rat. Cette étude permet également de caractériser les altérations de l'aptitude aérobie chez le rat qui seront indispensables pour mettre en évidence les répercussions des programmes d'endurance. Les vitesses de course du tapis roulant sont basées sur la  $V_{SL}$  et sont donc individualisées pour chaque animal.

#### ***5.2 Matériels & méthodes de l'étude n°3***

##### **5.2.1 Animaux**

Au total, 108 rats adultes mâles Sprague-Dawley (Centre d'élevage Roger JANVIER, Genest-Saint-Isle, France) ont été utilisés mais 72 rats ont pu être inclus dans cette étude (40 % de mortalité sur les rats opérés et 5 % d'animaux présentent des déficits moteurs trop légers d'après le score neurologique non-présenté ici). Ces animaux sont placés dans une cage individuelle en respectant un cycle lumière/obscurité de 12 h avec nourriture et eau *ad libitum*. La température de la pièce est maintenue à 22°C. Aucun signe d'hyperactivité,

d'anorexie et de prostration n'est observé au cours du protocole. Le poids des animaux est également contrôlé quotidiennement. Ce protocole a été validé par le comité d'éthique local d'Aix-Marseille Université et du CNRS.

### 5.2.2 Protocole expérimental

Ces animaux sont aléatoirement répartis dans les 6 groupes expérimentaux suivants :

- 1) Témoin (n=15), où les animaux ne subissent aucune chirurgie.
- 2) SHAM (n=9), où les animaux subissent les premières étapes de la chirurgie MCAo-r, sans réaliser l'occlusion cérébrale.
- 3) MCAO (n=13), où l'ischémie cérébrale est réalisée mais ces animaux n'effectuent pas de protocole d'entraînement.
- 4) MOD (n=13), où les rats subissent l'ischémie cérébrale et effectuent le programme d'intensité modérée.
- 5) HIT (n=13), où les rats subissent l'ischémie cérébrale et suivent le programme d'intensité élevée.
- 6) MCAO-J1 (n=6), où les rats subissent l'ischémie cérébrale et sont sacrifiés 1 jour après la lésion afin de confirmer que le volume de l'infarctus est reproductible entre les animaux.
- 7) Expérimentations complémentaires (n=3) : ces animaux ont été utilisés pour montrer l'influence potentielle du prélèvement régulier du lactate sanguin sur la performance maximale lors du test d'effort incrémental. En effet, une étude suggère que la mesure du lactate sanguin pourrait diminuer la performance des animaux à cause d'une baisse de la concentration d'hémoglobine (Høydal *et al.*, 2007). Ces animaux ont réalisé une épreuve d'effort incrémentale pour déterminer la vitesse maximale sans mesure de lactate (*i.e.* sans prélèvement de sang). Un temps d'arrêt de 15 s est imposé à la fin de chaque palier. Cela correspond à la durée moyenne mise par l'expérimentateur pour réaliser le prélèvement de

sang comme pour les animaux des autres groupes de l'étude.

### *Déroulement du protocole*

Chez des animaux éveillés, il est réalisé:

- 1) la familiarisation avec les tests comportementaux et le tapis roulant à raison de 3 jours par semaine durant 2 semaines.
- 2) l'évaluation de la récupération fonctionnelle avant (PRE) puis à J1, J7 et J14 à partir du test de la force de préhension des pattes antérieures, du test de suspension par la queue et du test de l'échelle inclinée.
- 4) la réalisation d'un test d'effort incrémental à J1 et J14 avec les mesures de la  $V_{SL}$  et de la  $V_{max}$ .
- 5) l'entraînement de J2 à J6 et de J8 à J13 pour les animaux des groupes HIT et MOD.

Sur des animaux anesthésiés, il est réalisé:

- 1) la chirurgie pour induire l'occlusion de l'ACM pour les groupes lésés et cette même chirurgie mais sans occlusion pour les groupes SHAM.
- 2) le prélèvement de l'encéphale afin de pouvoir effectuer les analyses immunohistochimiques et de Western blot pour évaluer la taille de la lésion, la réponse inflammatoire et les marqueurs de la neuroplasticité.

### **5.2.3 Induction d'une ischémie cérébrale par la MCAo-r**

La préparation de l'animal ainsi que la chirurgie pour induire l'ischémie cérébrale est identique à celles des Chapitres I et II (*cf. p.57-58*) (Uluç *et al.*, 2011).



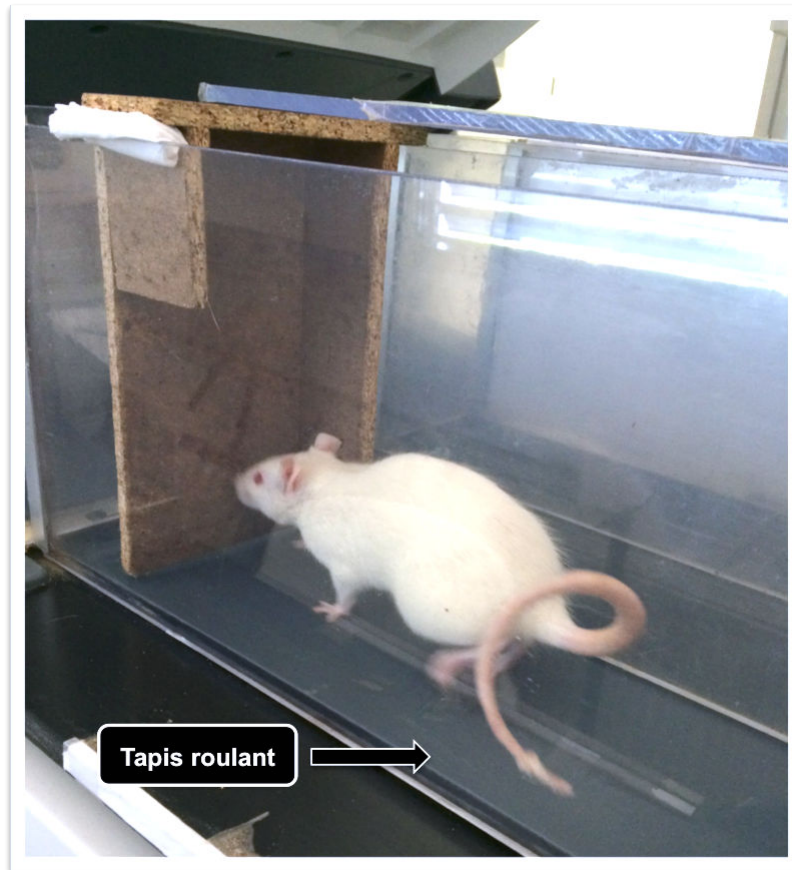
### 5.2.4 Analyse comportementale : évaluation de la récupération fonctionnelle

Les déficits fonctionnels sont évalués de manière globale à partir de 3 tests comportementaux durant 15 jours. Ces tests mesurent la force de préhension des pattes antérieures, l'asymétrie motrice (test de la suspension par la queue) et la précision du geste de la patte antérieure gauche (le test de l'échelle inclinée) (*cf. Chapitre I, section 5.2.4 - p.59-63*). Bien que chaque test ne provoque qu'une fatigue minimale, le temps de récupération entre les tests comportementaux est d'environ 15 min.

### 5.2.5 Évaluation de l'aptitude aérobie

#### *Utilisation du tapis roulant*

Les épreuves d'effort ainsi que toutes les séances d'entraînement sont réalisées sur un tapis roulant (**Figure 3.15**). Le choix du tapis roulant (exercice forcé) semble plus pertinent que celui de la roue (exercice volontaire) car l'utilisation du tapis roulant est la méthode la plus efficace pour réduire la taille de la zone ischémique (-30 % en moyenne) et améliorer les fonctions locomotrices de l'animal par rapport à l'exercice volontaire sur roue (-18 %) ou les exercices des tâches d'apprentissage spécifiques (*Schmidt et al., 2014*). D'un point de vue méthodologique, il est possible de contrôler la vitesse de course et la durée et de s'assurer que la charge de travail soit équivalente entre les groupes expérimentaux.



*Figure 3.15 : Tapis roulant utilisé pour les tests d'effort et les entraînements d'endurance.*

### *Épreuve d'effort incrémentale et détermination de la vitesse maximale ( $V_{max}$ )*

L'épreuve d'effort incrémentale est réalisée sur un tapis roulant ( $1^\circ$  d'inclinaison) à J1 et à J14 après l'ischémie cérébrale/chirurgie. L'exercice débute par 5 min d'échauffement à 9 m/min permettant de diminuer le stress associé à la situation et solliciter progressivement le métabolisme aérobie. Ensuite, la vitesse de course est augmentée de 3 m/min toutes les 3 minutes (Carvalho *et al.*, 2005). Chaque palier est entrecoupé d'une période d'arrêt de 10-15 sec au cours de laquelle les prélèvements sanguins sont réalisés (voir ci-dessous) (Billat, 2005). L'épreuve est arrêtée lorsque l'animal ne peut plus maintenir la vitesse imposée malgré les stimulations sonores (encouragements verbaux et air comprimé) et les chocs électriques légers. La fin de l'épreuve est caractérisée par une perturbation visible de la coordination inter-segmentaire et une difficulté à revenir à la position initiale de course malgré les

encouragements et stimulations (Carvalho *et al.*, 2005; Billat, 2005; Thomas *et al.*, 2007). La  $V_{\max}$  correspond alors à la vitesse du dernier palier atteint. Elle est exprimée en % de la  $V_{\max}$  obtenue à J1 pour évaluer la progression de l'animal sur ce paramètre (avant et après la période d'entraînement).

### ***Détermination du SL au cours de l'épreuve d'effort incrémentale***

Les prélèvements de sang (0,2  $\mu$ l) sont réalisés au niveau de la queue (nettoyage à l'alcool à 70°) après avoir partiellement sectionné la partie distale de la veine caudale à l'aide d'un scalpel (Figure 3.16). La concentration de lactate sanguin (en mmol/l) est alors mesurée à partir d'un analyseur portable (*Lactate Scout+*, EKF diagnostics, Magdeburg, France) dont la précision a été préalablement vérifiée à partir d'une solution étalon de lactate de 8,9 à 11,1 mmol/l. Cet appareil a déjà été validé pour le modèle animal (Jafari *et al.*, 2009). Les mesures sont réalisées avant le début de l'exercice (au repos), à la fin de chaque palier (durée : 10-15 sec) et deux minutes après l'arrêt de l'épreuve d'effort (Billat, 2005; Brito Vieira *et al.*, 2014). L'évolution des concentrations de lactate permet de mettre en évidence la  $V_{SL}$  (Figure 3.16). Il est considéré que le SL est détecté au palier précédent la première augmentation de la concentration de lactate (Bentley *et al.*, 2007; Jafari *et al.*, 2009). Le SL est déterminé à partir de 2 méthodes : 1) visualisation du point d'inflexion de la concentration de lactate (Brito Vieira *et al.*, 2014) et 2) augmentation de 1 mmol/l entre deux valeurs de lactate (Billat, 2005). Elle est exprimée en % de la  $V_{SL}$  obtenue à J1 pour évaluer la progression de l'animal sur ce paramètre (avant et après la période d'entraînement).

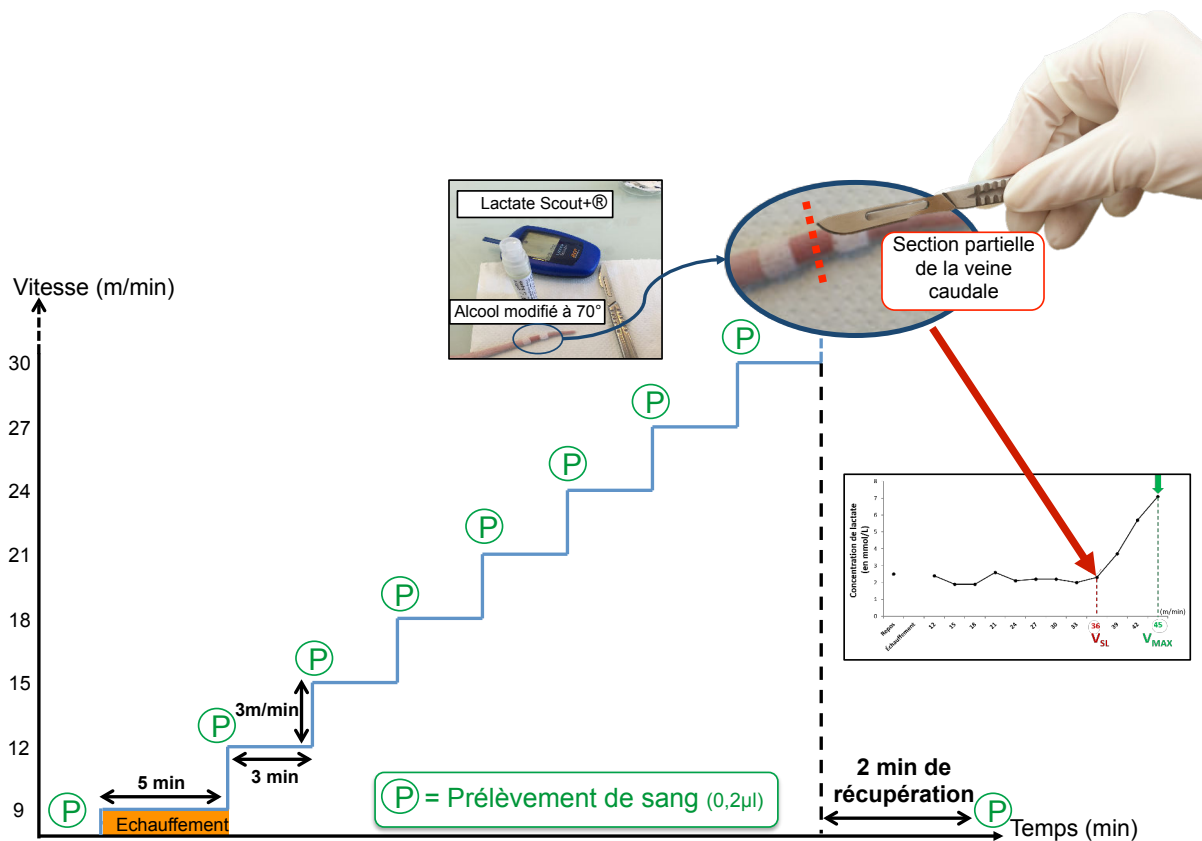


Figure 3.16 : Protocole du prélèvement de lactate et de l'épreuve d'effort incrémentale sur tapis roulant. Une goutte de sang est prélevée toute les 3 min (à la fin de chaque paliers) afin de mesurer la lactatémie.

### Programmes d'endurance : HIT et MOD

En accord avec plusieurs travaux précédents, les 2 programmes de rééducation débutent de manière précoce, la charge de travail est progressive au cours des protocoles et l'intensité de course est individualisée (Marsden *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2014). Plus précisément, les 2 programmes débutent à J2 (le lendemain de l'épreuve d'effort) et se terminent à J12. Ils sont constitués de 10 séances réparties sur 2 semaines avec un jour de récupération après les 5 premières séances (à J7). Le J13 est également un jour de récupération entre la dernière séance et le test d'effort incrémental à J14. Ceci peut limiter la fatigue accumulée durant les séances précédentes pouvant affecter la performance lors du test d'effort. Chaque séance débute par 5 min d'échauffement dont la vitesse de course est fixée à -30 % de la  $V_{SL}$ . Les vitesses de course sont basées sur la  $V_{SL}$  pour tous les animaux ( $V_{SL} < HIT < V_{max}$  et  $MOD < V_{SL}$ ).

**Programme HIT.** L'exercice est constitué de 4 x 4 min de course séparées par 3 min de récupération active. La vitesse de course est fixée à 80 % de la variation entre la  $V_{SL}$  et la  $V_{max}$  de la 1<sup>ère</sup> à la 5<sup>ème</sup> séance. Cela permet d'une part de s'assurer que la vitesse est supérieure à celle correspondante au SL (caractéristique majeure des HIT), et d'autre part, qu'elle ne dépasse jamais la  $V_{max}$ . Ensuite, l'intensité est fixée à 95 % de cette même variation (entre  $V_{SL}$  et  $V_{max}$ ) de la 6<sup>ème</sup> à la 10<sup>ème</sup> séance. L'intensité est donc bien progressivement croissante au cours du protocole. La vitesse de récupération active correspond à celle où le SL est détecté.

**Programme MOD.** La vitesse de course est fixée à -20 % de la  $V_{SL}$ . La durée de la séance pour le groupe MOD est calculée afin que la charge de travail soit égale à celle du groupe HIT. Pour cela, la charge de travail (en Joule) est calculée à partir de la formule suivante (Pederson *et al.*, 2005) :

- **Masse (kg) x Intensité (m/min) x Durée (min) x inclinaison du tapis (°) x 9.8 (J/kg.m).**

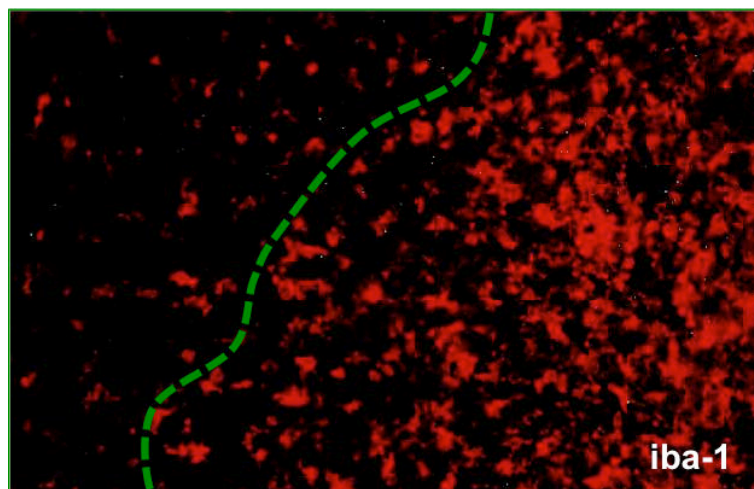
### 5.2.6 Analyses immunohistologiques : évaluation des marqueurs de la neuroplasticité et de la taille de la lésion

#### *Perfusion intracardiaque et fixation des tissus*

Pour cette étude, les animaux sont anesthésiés avec un mélange de kétamine/Xylazine (100mg/kg-10mg/kg) à J15 post-MCAo-r. La chirurgie de la perfusion intracardiaque est rigoureusement identique à celle du Chapitre I et II (*cf. p.69-70*). Les coupes de cerveaux sont réalisées à une épaisseur de 100  $\mu$ m à l'aide d'un cryostat puis montée sur des lames en verre en série de 4.

### *Immunofluorescence*

La réponse inflammatoire est mesurée à partir du marquage de la protéine Iba-1 (**Figure 3.17**). Cette dernière est utilisée pour révéler la quantité de cellules microgliales, mais ne permet pas de distinguer les monocytes/macrophages circulants (dans le milieu sanguin) de la microglie résidente. En revanche, Iba-1 est bien exprimée dans la microglie mais on ne la trouve pas dans les astrocytes, oligodendrocytes et les neurones (Beynon & Walker, 2012).



**Figure 3.17** : Coupe coronale de cerveau illustrant l'expression de la protéine Iba-1 7 jours post-ischémie cérébrale chez le rat. La microglie est fortement présente (en rouge) au niveau du cœur ischémique (en noire) en réponse à une ischémie cérébrale [Adaptée de (Ito et al., 2001)].

Le marquage de cette protéine est réalisé par immunofluorescence indirecte d'après le protocole suivant:

1) Les coupes cryogénisées sont d'abord réhydratées avec du PBS-1X (Sigma, St. Louis, Missouri, États-Unis) puis les membranes cellulaires sont perméabilisées grâce à une solution de PBS avec 0,3 % de triton-100X et 5 % de sérum de chèvre (NGS, *Normal Goat Serum*) pendant 30 min à température ambiante.

2) Les coupes sont ensuite incubées pendant 12 h à 4°C dans une solution de PBS avec 0,3 % de triton-100X et 5 % de NGS dans laquelle est ajoutée l'anticorps primaire (AC 1<sup>aire</sup>) de lapin anti-Iba-1 avant d'être rincées avec du PBS-1X (**Tableau 3.1 pour dilution des AC**).

3) Enfin les coupes sont à nouveau incubées durant 2 h dans une solution de PBS avec 0,3 % de triton-100X et 5 % de NGS dans laquelle est ajoutée l'anticorps secondaire (AC 2<sup>aire</sup>) anti-lapin. Une fois les coupes rincées avec du PBS-1X, les noyaux de toutes les cellules sont marqués avec du *Hoechst*.

4) L'acquisition des images est réalisée à partir d'un microscope confocal *Olympus Fluorview-500* (40x ; 1.0 NA). L'analyse quantitative est effectuée dans la région péri-lésionnelle au niveau des hémisphères ipsi- et controlatéral. L'acquisition des images est consécutivement réalisée pour le marquage Iba-1 puis *Hoechst* (Z-stack<sup>1</sup> : 25 µm tous les 2,5 µm). La morphologie des cellules positives au marquage Iba-1 est manuellement évaluée avec le logiciel ImageJ. Les paramètres d'acquisition sont identiques pour toutes les conditions expérimentales. Pour chaque hémisphère, la quantité de cellules positives Iba-1 de type amiboïde est normalisée sur la quantité totale de cellules positives Iba-1.

### ***Western Blotting (WB)***

À la fin de l'expérimentation, quelques animaux sont anesthésiés avec un mélange de kétamine/xylazine (100mg/kg-10mg/kg) avant d'être sacrifiés. L'encéphale des animaux est rapidement prélevé puis les hémisphères ipsilésionnel et controlésionnel sont séparés et congelés avec de l'azote liquide avant d'être conservés à -80 °C.

La technique du *western blotting* consiste à identifier une protéine cible dans un échantillon de cellule ou de tissus composé de plusieurs protéines (mesure semi-quantitative<sup>2</sup>) (Towbin *et al.*, 1979; Kurien & Scofield, 2006). Brièvement, les protéines d'un échantillon sont séparées par électrophorèse en fonction de leur poids moléculaire. Un AC 1<sup>aire</sup> et 2<sup>aire</sup> sont ensuite utilisés pour déceler la quantité relative de la protéine d'intérêt. Pour notre étude, nous

---

<sup>1</sup> Couches accumulées dans le plan Z.

<sup>2</sup> Signifie que le WB fournit une comparaison relative du taux de protéine (d'une condition à une autre) et donc que la mesure des quantités n'est pas absolue.

avons quantifié la protéine membranaire p75<sup>NTR</sup> et les deux co-transporteurs du Cl<sup>-</sup>, la protéine NKCC1 et KCC2.

### Préparation des tissus et extraction des protéines

Les tissus congelés (2 échantillons par animaux : hémisphère ipsilésionnel et controlésionnel) sont traités avec une solution composée 1) de tampon de lyse contenant du RIPA<sup>1</sup> afin de briser les membranes cellulaires pour libérer les protéines et 2) d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (*ThermoFisher*). En parallèle, les tissus sont mécaniquement dégradés pour renforcer l'action du tampon de lyse sur la libération des protéines.

### Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Cette étape permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse en utilisant un gel de polyacrylamide (4-15 % ; *Criterion gel, Bio-Rad*) composé de plusieurs puits dans lesquels sont déposés les protéines. Ce gel est disposé dans un appareil d'électrophorèse.

Une quantité de protéine donnée (obtenue d'après l'étape de mesure de la concentration de protéines) est prélevée pour chaque échantillon puis ajoutée dans une solution contenant de l'eau et du tampon *Laemmli 3-X*. Ce dernier est composé de β-mercaptoéthanol<sup>2</sup>, de glycérol, de SDS<sup>3</sup> et d'un colorant, le bleu de bromophénol. Le SDS permet de charger négativement les protéines de manière uniforme. Ce tampon a également pour rôle de dénaturer<sup>4</sup> les protéines et de faciliter le dépôt des protéines dans les puits.

---

<sup>1</sup> *Radio immuno-precipitation assay (50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; SDS 0.1 %; Acide désoxycholéique 0.5 %; 1 % triton 100-X) : ce type de tampon est conseillé pour les extraits de cellule entière (notamment pour les protéines nucléaires) et de protéines membranaires.*

<sup>2</sup> *Composant sulfhydryl empêchant la reformation des ponts disulfures (liaisons covalentes) des protéines.*

<sup>3</sup> *Le dodécylsulfate de sodium est un détergent et tensioactif ionique fort.*

<sup>4</sup> *La dénaturation est un processus par lequel une protéine perd sa conformation tridimensionnelle normale induisant une perte de leur repliement. Ces protéines se déplient alors complètement. La dénaturation induit une inactivation des protéines puisque leur conformation tridimensionnelle est nécessaire pour que les protéines puissent remplir leur fonction.*



Une fois les échantillons déposés dans les puits, un courant électrique (1 h30 à 75 V) est appliqué afin de lancer la migration des protéines du pôle négatif vers le pôle positif aux travers du gel de polyacrylamide (dimension : de haut en bas). Les protéines avec un poids moléculaire faible sont moins retenues par le maillage du gel et migrent plus rapidement vers le bas alors que celles avec un poids moléculaire plus élevé restent vers le haut. Les protéines sont alors séparées en fonction de leur poids moléculaire. Un des puits est réservé au marqueur de poids moléculaire, une solution servant de référence pour estimer le poids moléculaire des protéines d'intérêt.

#### **Transfert de protéines**

Cette étape consiste à transférer les protéines contenues sur le gel de polyacrylamide vers une membrane en nitrocellulose (*Whatman*), une surface plus adéquate pour effectuer la détection des protéines par les AC. Pour cela, la membrane est placée contre le gel de polyacrylamide entre une anode et une cathode dans un appareil de transfert. Un champs électrique est alors appliqué (7 min) induisant le transfert des protéines chargées négativement incrustées dans le gel vers la membrane en nitrocellulose. La membrane est ensuite hydratée et rincée avec du *Tris-buffered saline* avec du *Tween* (TBS-T) et conservée à 4°C.

#### **Blocage des sites aspécifiques sur la membrane en nitrocellulose**

Cette étape est importante puisqu'elle permet de limiter l'interaction de protéines aspécifiques avec les AC des protéines d'intérêts sur la membrane. Pour bloquer les sites aspécifiques, 5 % d'albumine de sérum bovin (BSA) est ajoutée dans une solution de TBS-T bouchant les pores de la membrane laissés libres par les protéines.

### Immunodétection des protéines p75<sup>NTR</sup>, KCC2 et NKCC1 et de leurs standards

1) La membrane en nitrocellulose contenant les protéines est incubée dans une solution de TBS-T avec 2,5 % de BSA dans laquelle est diluée l'AC 1<sup>aire</sup> de souris anti-NKCC1 ou l'AC 1<sup>aire</sup> de lapin anti-KCC2 ou l'AC 1<sup>aire</sup> de souris anti-p75<sup>NTR</sup> durant 12 h à 4°C. La membrane est ensuite rincée dans du TBS-T pour supprimer l'excès d'AC 1<sup>aire</sup> (**Tableau 3.1 pour dilutions des AC**).

2) La membrane est ensuite incubée dans du TBS-T avec 2,5 % de BSA dans laquelle est diluée un AC 2<sup>aire</sup> fluorescent anti-souris pour le NKCC1 et le p75<sup>NTR</sup> et l'AC 2<sup>aire</sup> fluorescent anti-lapin pour le KCC2 durant 2 h avant d'être rincé avec du TBS-T pour supprimer l'excès d'AC 2<sup>aire</sup>.

3) Pour effectuer la normalisation des protéines d'intérêt, la membrane est à nouveau incubée avec un AC 1<sup>aire</sup> de souris anti-GAPDH<sup>1</sup> (pour p75<sup>NTR</sup> et NKCC1) et un AC 1<sup>aire</sup> de lapin anti- $\beta$ 3-tubuline<sup>2</sup> (pour KCC2) durant 2 h à 4°C puis avec un AC 2<sup>aire</sup> fluorescent anti-souris ou anti-lapin durant 15 min.

4) Lors de la révélation, les bandes de protéines sont détectées suite à l'émission d'un signal fluorescent. L'intensité du signal est mesurée avec le logiciel d'analyse d'image G box (*Syngene*). Les bandes de protéines sont ensuite quantifiées avec le logiciel ImageJ (*Gel plot Analyser plugin*). Les ratios NKCC1/GAPDH, p75<sup>NTR</sup>/GAPDH et KCC2/ $\beta$ 3-tubuline sont calculés puis normalisés sur les mêmes ratios de la condition SHAM. L'expression de la protéine p75<sup>NTR</sup> est présentée en pourcentage de celle de la condition SHAM. Le ratio entre l'expression de NKCC1 par rapport à l'expression de KCC2 est également calculé.

---

<sup>1</sup> Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

<sup>2</sup> Protéine structurelle des microtubules, un constituant majeur du cytosquelette.

Anticorps	Espèce	Provenance	Concentration	Poids moléculaire
<b>Immunohistochimie</b>				
<b>Primaire</b>				
Iba-1	lapin	<i>Life Science</i>	1/500	
p75 <sup>NTR</sup>	souris	<i>Santa Cruz, Biotechnology</i>	1/1000	
<b>Secondaire</b>				
<i>Alexa Fluor 488</i>	souris	<i>Molecular probes</i>	1/500	
<i>Alexa Fluor 543</i>	lapin	<i>Molecular probes</i>	1/500	
<b>Western Blot</b>				
<b>Primaire</b>				
NKCC1	souris	(T4) <i>DSHB, University of Iowa</i>	1/2000	140 kDa
KCC2	lapin	<i>Home product (Ludwig et al., 2003)</i>	1/5000	140 kDa
p75 <sup>NTR</sup>	souris	<i>Santa Cruz, Biotechnology</i>	1/1000	55 kDa
$\beta$ 3-Tubuline	lapin	<i>Covance</i>	1/10000	50 kDa
GAPDH	souris	<i>Millipore</i>	1/500	35-38 kDa
<b>Secondaire</b>				
<i>Alexa Fluor 488</i>	souris	<i>Molecular probes</i>	1/500	
<i>Alexa Fluor 543</i>	lapin	<i>Molecular probes</i>	1/500	

Tableau 3.1 : Informations générales sur les anticorps utilisés en immunofluorescence et en western blotting.

### Coloration au crésyl violet

Quelques lames sont colorées au crésyl violet d'après le même protocole utilisé dans les Chapitres I et II (cf. p.69-70). Rappelons que la taille de la lésion est ensuite exprimée en pourcentage de l'hémisphère lésé et en pourcentage de l'encéphale.

### 5.2.7 Analyses statistiques

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type (SD). L'analyse statistique est effectuée à partir du logiciel SigmaStat (SigmaStat® 2.03, *Statistical software*, San Jose, CA, États Unis). Les valeurs des tests comportementaux à PRE, J1, J7 et J14 sont moyennées et comparées entre les groupes à partir d'une ANOVA à mesures répétées à 2 facteurs (temps x groupes). Les résultats de la  $V_{SL}$  et de la  $V_{max}$  sont moyennés et comparés entre les groupes à partir d'une ANOVA à mesures répétées à 2 facteurs (J1/J14 test d'effort x groupes). L'analyse post-hoc est réalisée à partir de la méthode *Student-Newman-Keuls* pour mettre en évidence les différences significatives. Un résultat est considéré comme significatif lorsque  $p < 0,05$  (1, 2 ou 3 symboles =  $p < 0,05$  ;  $p < 0,01$  ;  $p < 0,001$  respectivement).

### 5.3 Résultats de l'étude n°3

Pour l'ensemble des paramètres mesurés, aucune différence significative n'est observée de PRE à J14 pour les groupes Témoin et SHAM. De même, les résultats ne diffèrent pas significativement entre ces 2 groupes d'animaux non-lésés. Les valeurs PRE ne diffèrent pas entre les 5 groupes d'animaux.

#### 5.3.1 Caractéristiques des séances de rééducation

La durée des séances (échauffement non compris) pour les animaux HIT est fixée à 28 min tout au long du protocole (**Tableau 3.2**). En revanche, le volume des séances des animaux MOD est plus élevé que celui des animaux HIT lors de la 1<sup>ère</sup> semaine (+ 49,2 %) et de la 2<sup>ème</sup> semaine (+59,8 %). Pour le groupe HIT, la vitesse de course des séries située au-dessus de la  $V_{SL}$  est de  $24,5 \pm 2,6$  m/min lors de la 1<sup>ère</sup> semaine et de  $25,4 \pm 2,7$  m/min pour la 2<sup>ème</sup> semaine. Toujours pour les animaux HIT, la vitesse de course lors de la récupération active (=  $V_{SL}$ ) est de  $20,2 \pm 2,4$  m/min. Chez les animaux MOD, la vitesse de course est de  $17,5 \pm 2,6$  m/min (-28,9 % puis -31,2 % par rapport à la 1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> semaine du programme HIT respectivement). La charge de travail moyenne des deux groupes lors de la 1<sup>ère</sup> semaine est de  $1458 \pm 250$  Joules et de  $1654 \pm 342$  Joules pour la 2<sup>ème</sup> semaine (progression de 14 %).

	HIT		MOD	
	Semaine-1	Semaine-2	Semaine-1	Semaine-2
<b>Vitesse des séries (m/min)</b>	24,5±2,6	25,4±2,7	17,5±2,6	17,5±2,6
<b>Vitesse de récupération (m/min)</b>	20,2±2,4	20,2±2,4	Aucune	
<b>Durée des sessions (min)</b>	28	28	41,8±9,5	44,8±12,3
<b>Charge de travail totale (joules)</b>	1458±210	1654±342	1458±210	1654±342

**Tableau 3.2 :** Caractéristiques des séances d'entraînement en terme d'intensité d'exercice, de durée et de la charge de travail totale (i.e. dépense énergétique). Étant donné que l'entraînement MOD est caractérisé par des exercices continus à une intensité modérée sans intervalle, les animaux de ce groupe ne présentent aucune vitesse de récupération durant les sessions d'exercice. La charge de travail totale est la même entre les groupes puisque la dépense énergétique doit être équivalente entre les types d'exercice (HIT vs. MOD) afin d'évaluer seulement l'influence de l'intensité sur les paramètres mesurés.

### 5.3.2 Analyse comportementale : évaluation de la récupération fonctionnelle

#### *Test de force de préhension*

**Force de préhension exercée par les 2 pattes antérieures simultanément.** La force de préhension n'est pas modifiée de PRE à J14 pour l'ensemble des groupes. De même, il n'y a pas de différence significative entre les 5 groupes de J1 à J14 (*données non présentées*).

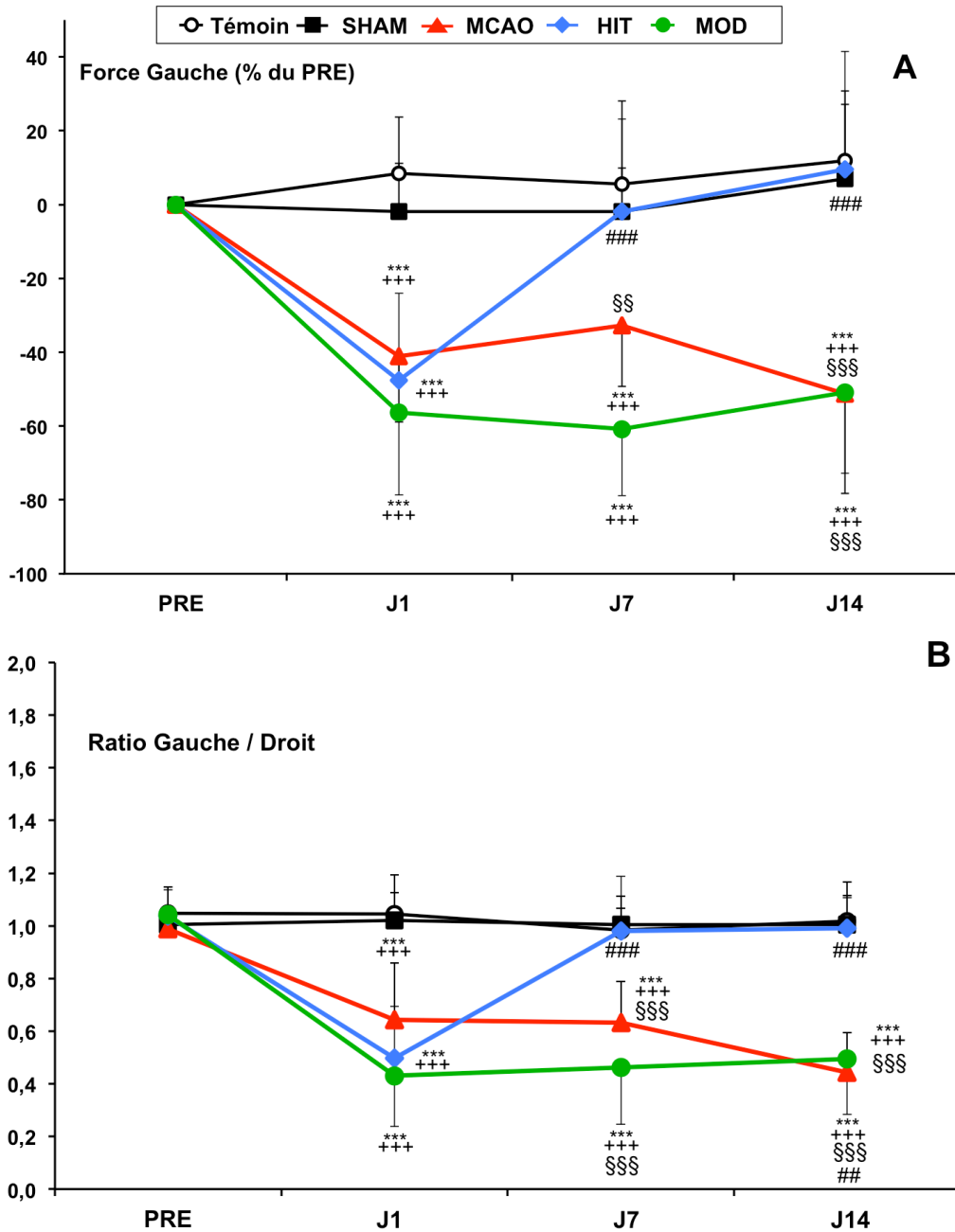
**Force de préhension exercée par la patte antérieure droite.** La force de préhension exercée par la patte droite n'est pas modifiée de PRE à J14 pour l'ensemble des groupes. Il n'y a pas non plus de différence significative entre les 5 groupes de J1 à J14 (*données non présentées*).

**Force de préhension exercée par la patte antérieure gauche (Force G).** La force de préhension exercée par la patte antérieure gauche est affectée par l'ischémie cérébrale mais récupère rapidement uniquement pour les animaux qui ont suivi le programme HIT (**Figure 3.18.A**). En effet, la Force G diminue significativement entre PRE et J1 ( $p < 0,001$  pour tous) pour les groupes MCAO (PRE :  $482,1 \pm 63,8$  g, J1 :  $307,4 \pm 98,7$  g), HIT (PRE :  $479,8 \pm 46,6$  g, J1 :  $253,5 \pm 120,0$  g) et MOD (PRE :  $515,8 \pm 77,9$  g, J1 :  $224,6 \pm 116,8$  g). À J1, la force obtenue n'est pas différente entre les groupes MCAO, HIT et MOD. En revanche, la force de ces 3 groupes est significativement plus faible par rapport à celle des groupes Témoin (J1 :  $591,0 \pm 83,4$  g,  $p < 0,001$ ) et SHAM ( $517,2 \pm 96,9$  g  $p < 0,001$ ).

La force obtenue à J7 et J14 reste significativement diminuée par rapport à la valeur PRE pour les groupes MCAO (J7 :  $324,5 \pm 88,4$  g ; J14 :  $228,3 \pm 113,3$  g,  $p < 0,01$ ) et MOD et (J7 :  $209,0 \pm 117,6$  g ; J14 :  $261,1 \pm 136,6$  g,  $p < 0,001$ ) contrairement au groupe HIT où la force de préhension augmente significativement par rapport à J1 (J7 :  $467,2 \pm 105,5$  g et J14 :  $524,0 \pm 150,2$  g,  $p < 0,001$ ) et n'est plus différente de sa valeur PRE. De plus, aucune différence n'a été observée entre les groupes Témoins, SHAM et HIT à J7 et J14 contrairement aux groupes MCAO ( $p < 0,001$ ) et MOD ( $p < 0,001$ ).

**Force G/D.** Ce rapport est fortement affecté par l'ischémie cérébrale et une récupération complète n'est visible que dans le groupe HIT (**Figure 3.18.B**). En effet, nos résultats indiquent que la force G/D mesurée à J1 diminue significativement par rapport à PRE pour les groupes MCAO, HIT et MOD ( $p < 0,001$  pour tous). De plus, la force G/D à J1 des groupes MCAO, HIT et MOD est significativement plus faible par rapport à celui des groupes Témoin et SHAM ( $p < 0,001$ ).

La force G/D du groupe HIT retrouve ses valeurs de base à J7 et J14 par rapport au PRE. D'ailleurs, la force G/D du groupe HIT augmente significativement de J1 à J7 et de J1 à J14 ( $p < 0,001$ ). De plus, elle est significativement plus élevée que celle des groupes MCAO et MOD à J7 et J14 ( $p < 0,01$ ) et ne montre plus de différences avec celle des groupes Témoin et des SHAM. En revanche, ce rapport reste significativement diminué à J7 et J14 pour les groupes MCAO et MOD ( $p < 0,001$  pour les deux groupes) et reste différente des groupes Témoin et SHAM ( $p < 0,01$ ).



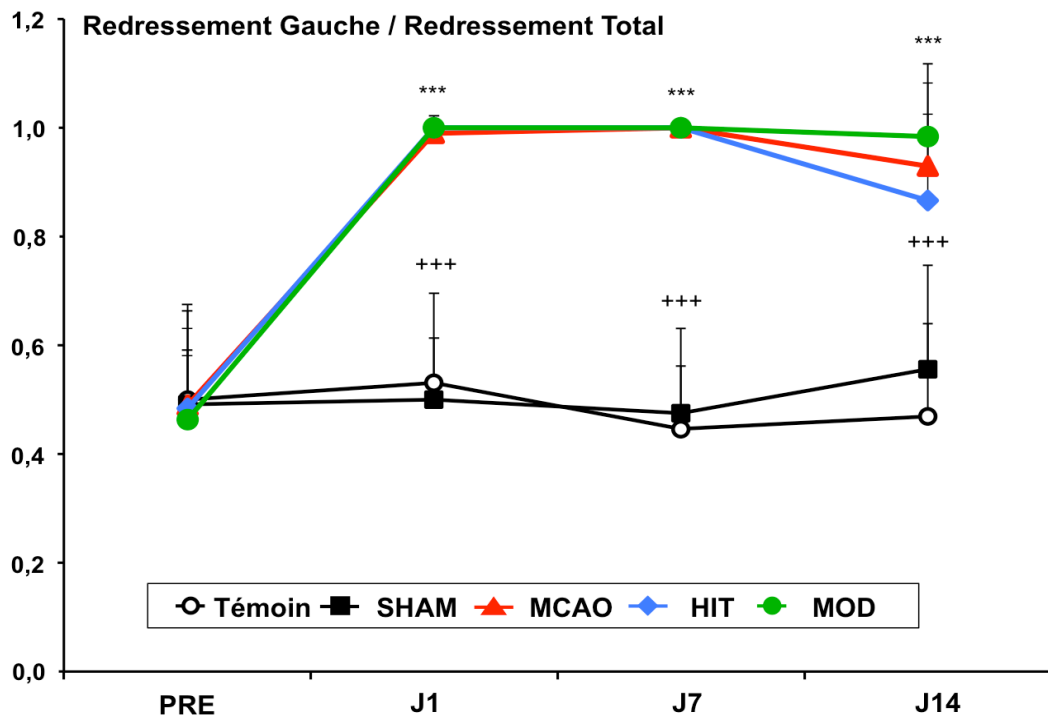
**Figure 3.18 : Test de force de préhension. A) Force de préhension exercée par la patte antérieure gauche, B) Force G/D.** \* indique une diminution à J1, J7 et J14 pour les groupes lésés par rapport à PRE. # indique une augmentation entre J1 et J7, J1 et J14 pour le groupe HIT et une diminution de J1 à J14 pour le groupe MCAO pour la force G/D. + indique que la force G/D ou la force G est plus faible entre les groupes lésés et non-lésés à J1, J7 et J14. § indique que la force G/D ou la force G est supérieure dans le groupe HIT par rapport aux groupes MOD et MCAO à J7 et J14.



*Test de suspension par la queue*

Nos résultats montrent que les animaux ayant subi l'ischémie cérébrale, avec ou sans rééducation, se redressent quasi-exclusivement sur la gauche de J1 à J14 (**Figure 3.19**). En effet, le rapport Redressement G / Redressement total augmente significativement pour les groupes MCAO, HIT et MOD à J1, J7 et J14 par rapport à la valeur PRE ( $p < 0,001$  pour tous).

De plus, le rapport Redressement G / Redressement total des groupes MCAO, HIT et MOD est significativement supérieur à celui des groupes Témoin et SHAM de J1 à J14 ( $p < 0,001$  pour tous). Il n'y a pas de différence entre les groupes HIT, MOD et MCAO.



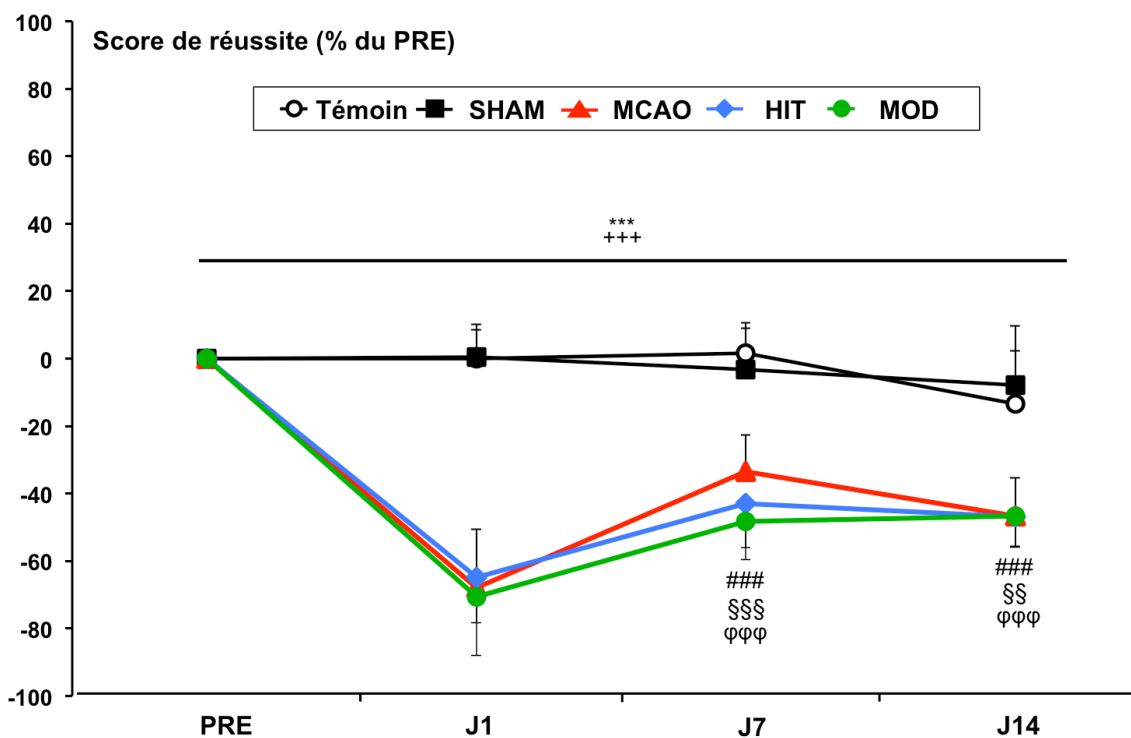
**Figure 3.19 : Test de suspension par la queue.** \* indique une augmentation du rapport Redressement G / Redressement total pour les groupes MCAO, HIT et MOD à J1, J7 et J14 par rapport à PRE. + indique un nombre de redressement à gauche supérieur pour les groupes MCAO, HIT et MOD par rapport aux groupes Témoin et SHAM de J1 à J14.

*Test de l'échelle inclinée*

Avec ou sans rééducation, la récupération de la capacité à saisir correctement les barreaux de l'échelle reste incomplète au cours des 14 premiers jours post-ischémique (Figure 3.20).

En effet, le score de réussite diminue significativement pour les groupes MCAO, HIT et MOD à J1, J7 et J14 par rapport au PRE ( $p < 0,001$  pour tous). En revanche, le score de réussite est significativement supérieur pour les groupes MCAO, HIT et MOD à J7 ( $p < 0,001$  pour tous) et à J14 ( $p < 0,001$  ;  $p < 0,01$  et  $p < 0,001$  respectivement) par rapport à J1.

Nos résultats montrent également que le score de réussite des groupes MCAO, HIT et MOD est significativement inférieur de J1 à J14 à celui des groupes Témoin et SHAM ( $p < 0,001$  pour tous). Il n'y a pas de différence entre les groupes HIT, MOD et MCAO.

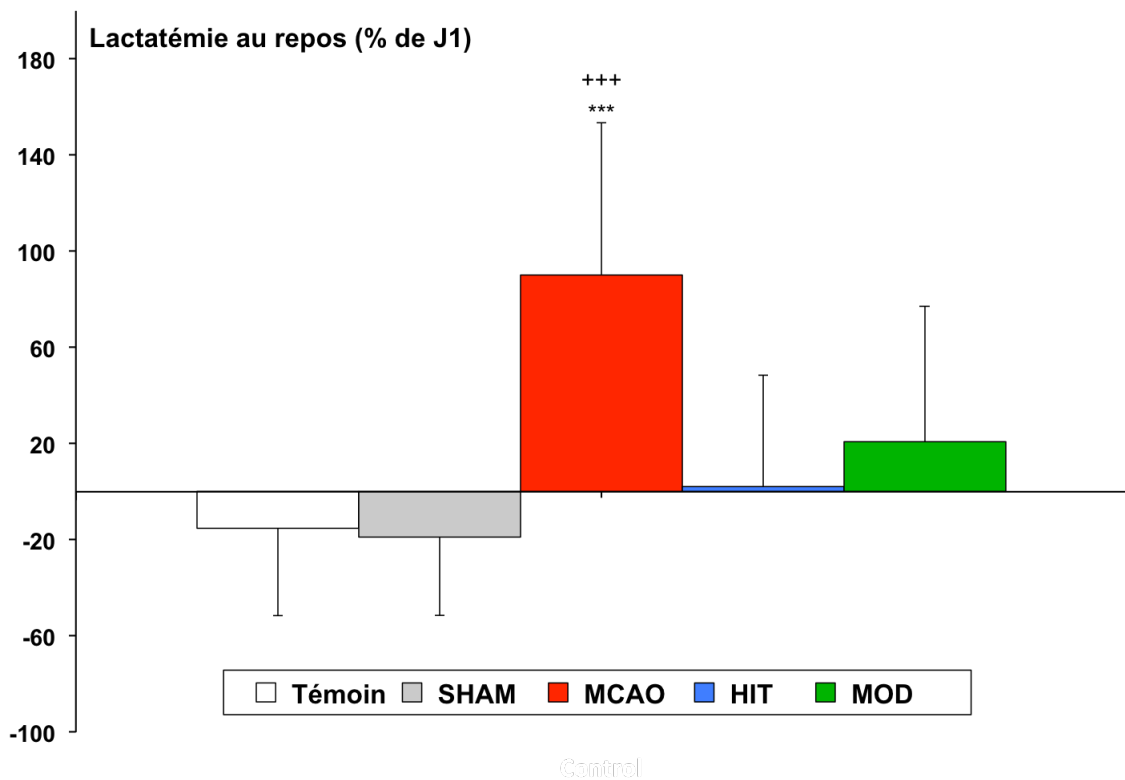


**Figure 3.20 : Test de l'échelle inclinée.** Le score de réussite est exprimé en % de la valeur PRE. \* indique une diminution du score de réussite à J1, J7 et J14 pour les groupes MCAO, HIT et MOD par rapport à PRE. Le score de réussite augmente entre J1 et J7 et J1 et J14 pour le groupe HIT (§), MOD (φ) et MCAO (#). + indique un score de réussite inférieur pour les groupes MCAO, HIT et MOD par rapport aux groupes Témoin et SHAM de J1 à J14.

### 5.3.3 Évaluation de l'aptitude aérobie

#### *Lactatémie mesurée au repos*

La lactatémie au repos est significativement plus élevée à J14 ( $4,4 \pm 1,4$  mmol/l) par rapport à celle de J1 ( $2,4 \pm 0,8$  mmol/l) uniquement pour le groupe MCAO (+ 90,3 % par rapport à J1 ;  $p < 0,001$ ) (**Figure 3.21**). De plus, la lactatémie au repos mesurée dans le groupe MCAO à J14 est significativement supérieure à celle des animaux des groupes Témoin ( $2,2 \pm 0,6$  mmol/l), SHAM ( $2,1 \pm 0,6$  mmol/l) et HIT ( $2,7 \pm 1,1$  mmol/l) et MOD ( $3,1 \pm 1,3$  mmol/l) ( $p < 0,001$  pour tous).



**Figure 3.21 : Lactatémie mesurée au repos.** La lactatémie est exprimée en % de la valeur à J1. \* indique une augmentation de la lactatémie au repos mesurée entre J1 et J14 uniquement pour le groupe MCAO. + indique une lactatémie au repos supérieure dans le groupe MCAO par rapport à tous les autres groupes à J14.

### *Épreuve d'effort incrémentale*

Nos résultats indiquent que le programme HIT est plus efficace pour améliorer l'aptitude aérobie que le programme MOD comme indiqué par les modifications de la  $V_{\max}$  et de la  $V_{SL}$ .

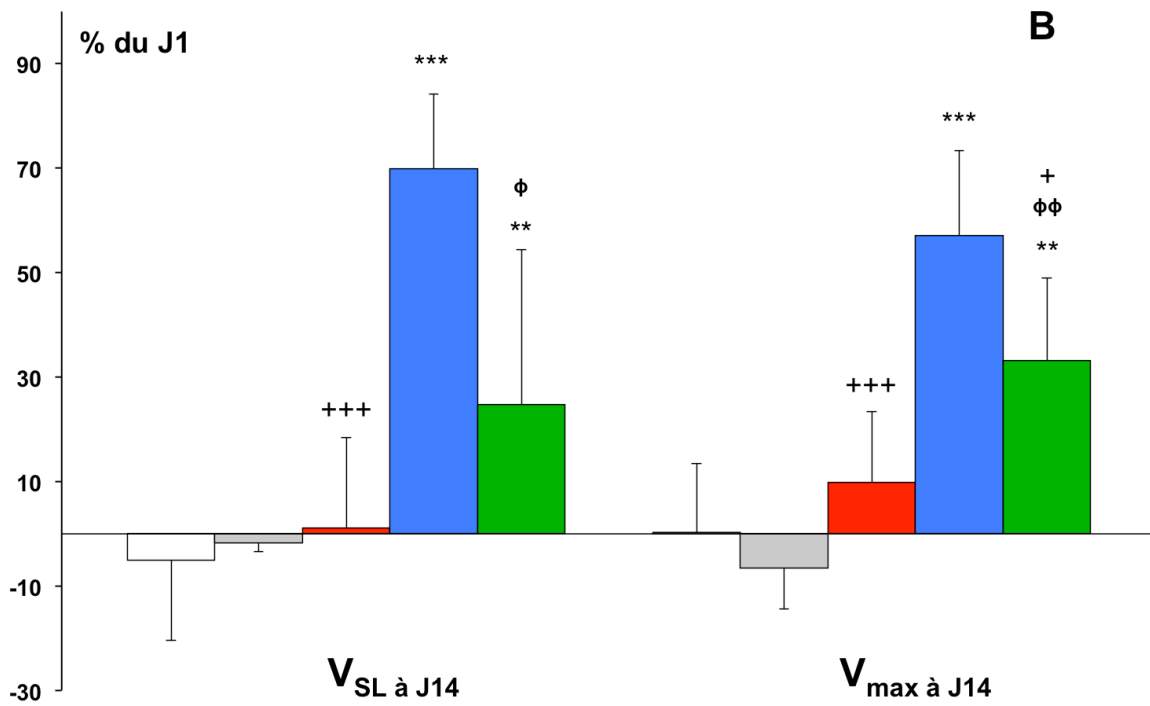
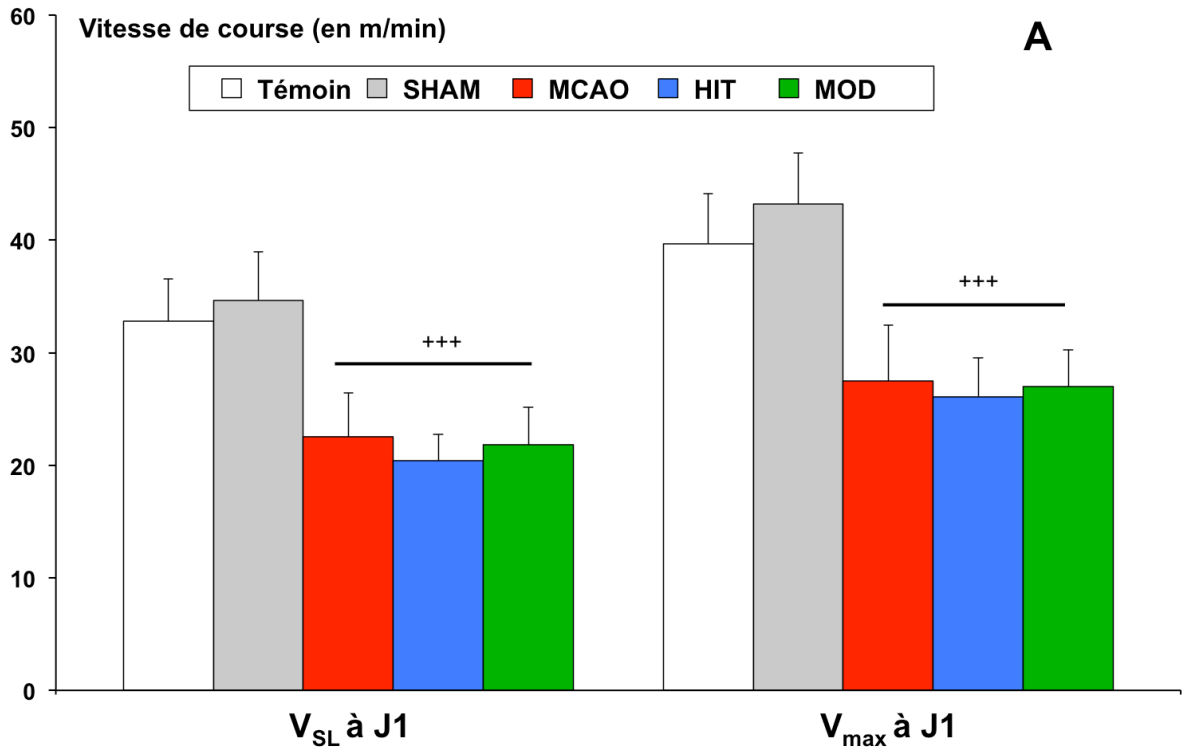
**Vitesse correspondante au SL.** L'ischémie cérébrale induit une diminution de la  $V_{SL}$  lors du test d'effort à J1 qui va augmenter à J14 uniquement chez les animaux rééduqués, mais de manière plus importante pour le groupe HIT (**Figure 3.22**). Ce résultat est illustré par un exemple de la cinétique de lactate sanguin obtenue durant un test d'effort incrémental réalisé avant et après un entraînement HIT (**Figure 3.22.C**).

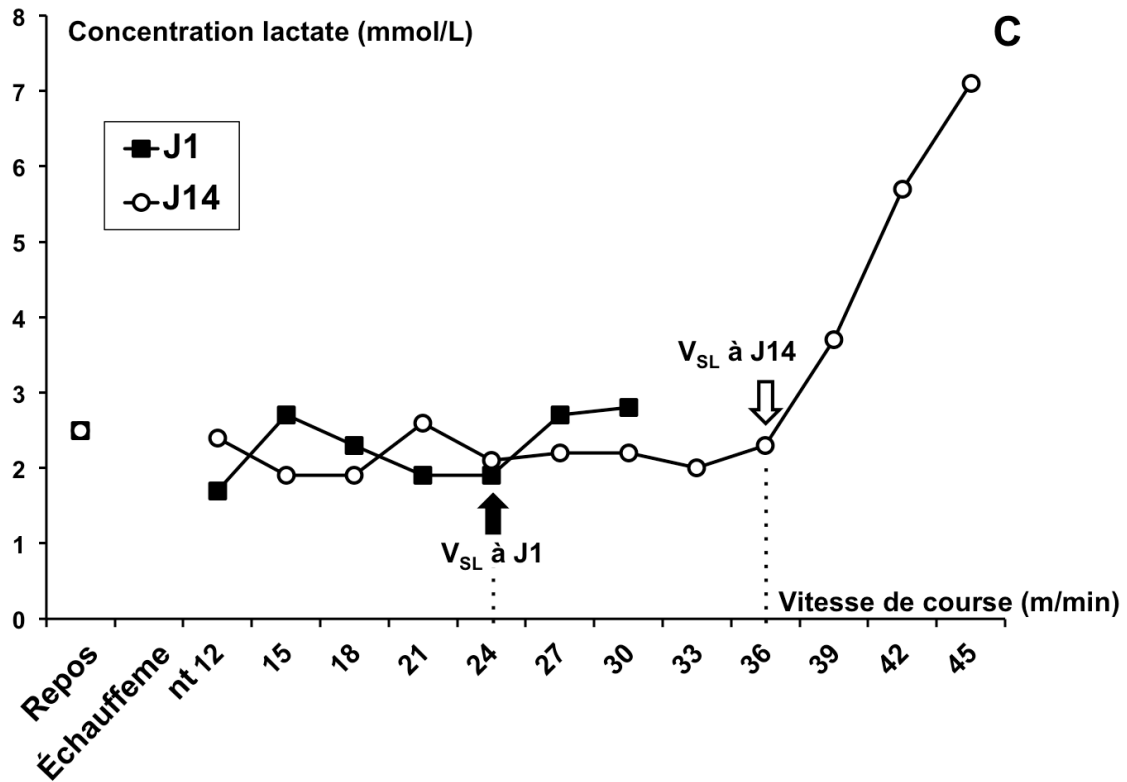
Nos résultats indiquent en effet qu'à J1, la  $V_{SL}$  dans les groupes MCAO ( $22,5 \pm 3,9$  m/min), HIT ( $20,4 \pm 2,4$  m/min) et MOD ( $21,8 \pm 3,3$  m/min) est significativement plus faible par rapport à celle des animaux Témoin ( $32,8 \pm 3,9$  m/min) et SHAM ( $34,7 \pm 4,3$  m/min) ( $p < 0,001$  pour tous). Cette  $V_{SL}$  augmente significativement de J1 à J14 pour les groupes HIT ( $34,5 \pm 3,8$  m/min à J14;  $69,8 \pm 14,4$  % ;  $p < 0,001$ ) et MOD ( $26,7 \pm 5,3$  m/min à J14 ;  $24,8 \pm 29,6$  % ;  $p < 0,01$ ) contrairement aux groupes MCAO ( $22,5 \pm 4,5$  m/min à J14 ;  $1,2 \pm 14,7$  %), Témoin ( $30,8 \pm 4,1$  m/min à J14 ;  $-5,0 \pm 15,4$  %) et SHAM ( $33,7 \pm 3,6$  m/min à J14 ;  $-1,7 \pm 14,7$  %) (**Figure 3.22.A**).

Cependant, la vitesse observée à J14 chez les animaux du groupe HIT est supérieure à celle des groupes MOD et MCAO ( $p < 0,001$  pour tous). Aucune différence n'est observée entre le groupe HIT et les groupes Témoins et SHAM. Par ailleurs, la  $V_{SL}$  observée dans le groupe MOD montre une récupération incomplète car la  $V_{SL}$  est supérieure à celle du groupe MCAO à J14 ( $p < 0,01$ ) mais reste significativement plus basse que celle des groupes Témoin et SHAM ( $p < 0,01$ ) (**Figure 3.22.B**).

**Vitesse maximale.** Une diminution de la  $V_{\max}$  est observée à J1 mais elle va être augmentée seulement chez les animaux rééduqués à J14, surtout pour les animaux HIT. En effet, nos résultats indiquent qu'à J1 la  $V_{\max}$  obtenue dans les groupes MCAO ( $27,5 \pm 4,9$  m/min), HIT ( $26,1 \pm 3,5$  m/min) et MOD ( $27,0 \pm 3,3$  m/min) est significativement plus faible par rapport à celle des groupes Témoin ( $40,0 \pm 4,5$  m/min) et SHAM ( $44,3 \pm 2,9$  m/min) ( $p < 0,001$  pour tous) (**Figure 3.22.A**). Cependant, la  $V_{\max}$  augmente significativement de J1 à J14 pour les groupes HIT ( $40,8 \pm 5,9$  m/min à J14 ;  $57,1 \pm 19,3$  % ;  $p < 0,001$ ) et MOD ( $35,7 \pm 4,5$  m/min à J14 ;  $33,1 \pm 15,8$  % ;  $p < 0,001$ ) contrairement aux animaux MCAO ( $30 \pm 5,4$  m/min à J14 ;  $9,8 \pm 13,6$  %), Témoin ( $39,8 \pm 4,3$  m/min à J14 ;  $0,3 \pm 13,2$  %) et SHAM ( $41,3 \pm 2,9$  m/min à J14 ;  $-6,5 \pm 7,9$  %) (**Figure 3.22.B**). De plus, la  $V_{\max}$  observée à J14 dans le groupe HIT est supérieure à celle des groupes MOD ( $p < 0,05$ ) et MCAO ( $p < 0,001$ ). Aucune différence n'est observée entre le groupe HIT et les groupes Témoin et SHAM. Par ailleurs, la  $V_{\max}$  observée dans le groupe MOD est supérieure de celle du groupe MCAO à J14 ( $p < 0,01$ ) mais reste significativement inférieure que celle des groupes Témoin et SHAM ( $p < 0,05$ ).

Expérimentations complémentaires. La  $V_{\max}$  des 3 animaux additionnels n'est pas différente des animaux Témoin et SHAM (*données non présentées*).



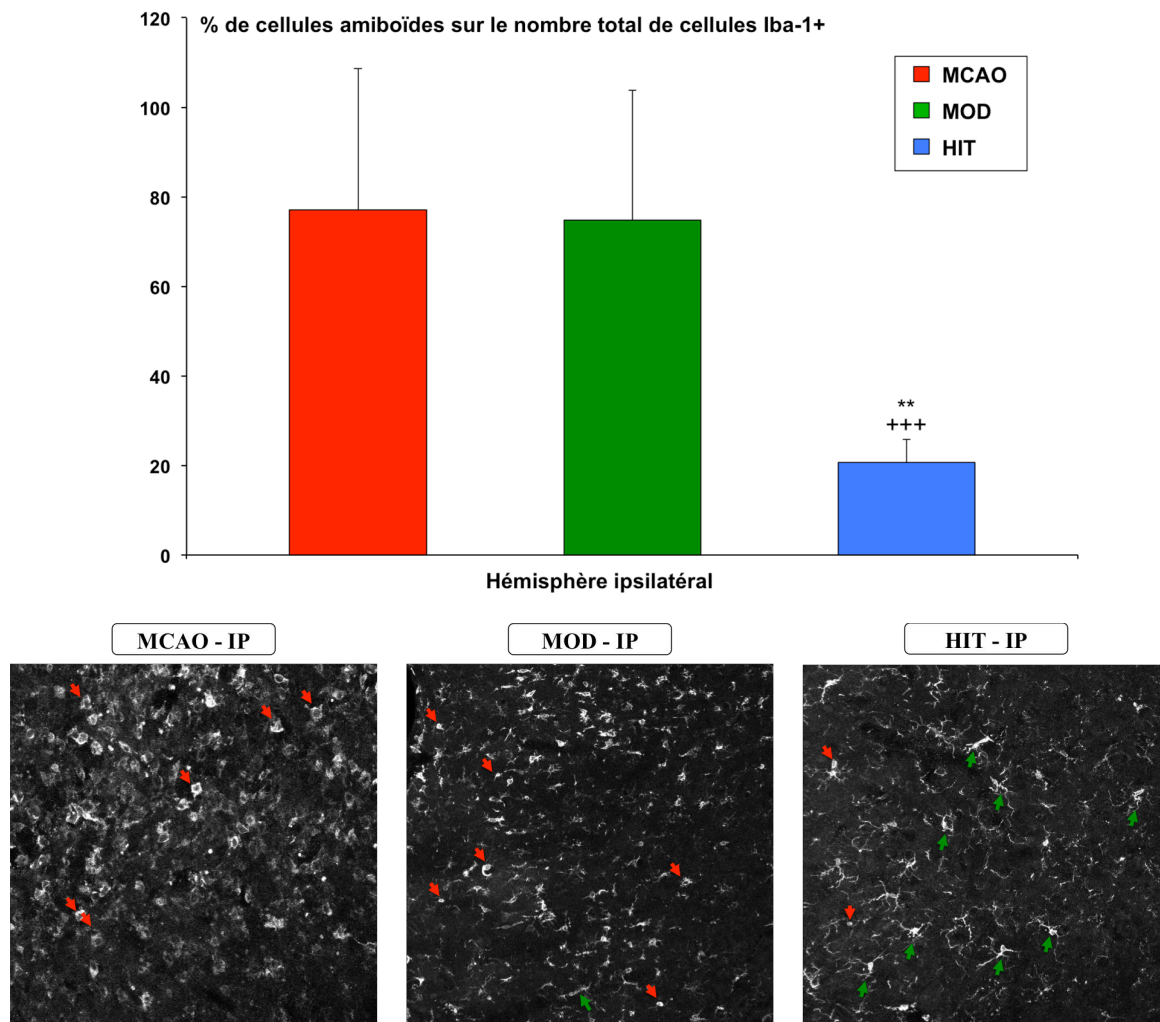


**Figure 3.22 :** Évolution de la performance en endurance PRE et POST entraînement. A) Vitesse correspondante au SL ( $V_{SL}$ ) et à  $V_{max}$  (m/min) à J1 après l'ischémie cérébrale. + indique une  $V_{SL}$  et une  $V_{max}$  inférieure pour les animaux des groupes MCAO, HIT et MOD comparés aux animaux des groupes Témoin et SHAM. B) Vitesse correspondante au SL et  $V_{max}$  (m/min) à J14 après l'entraînement, exprimée en% de la  $V_{SL}$  obtenue à J1. \*indique une augmentation de la  $V_{SL}$  et de la  $V_{max}$  entre J1 et J14 pour les animaux des groupes HIT et MOD. + indique une  $V_{SL}$  et une  $V_{max}$  à J14 supérieure pour les animaux des groupes HIT, Témoin et SHAM par rapport aux groupes MCAO et MOD.  $\phi$  indique une  $V_{SL}$  et  $V_{max}$  supérieure pour le groupe MOD par rapport au groupe MCAO. C) Exemple représentatif de l'évolution de la lactatémie chez un rat qui a suivi le programme HIT à J1 et à J14. On peut voir que le SL est repoussé vers des vitesses bien plus élevées à J14. La flèche indique les SL.

### 5.3.4 Analyses immunohistologiques : évaluation des marqueurs de la neuroplasticité et de la taille de la lésion

#### *Immunofluorescence*

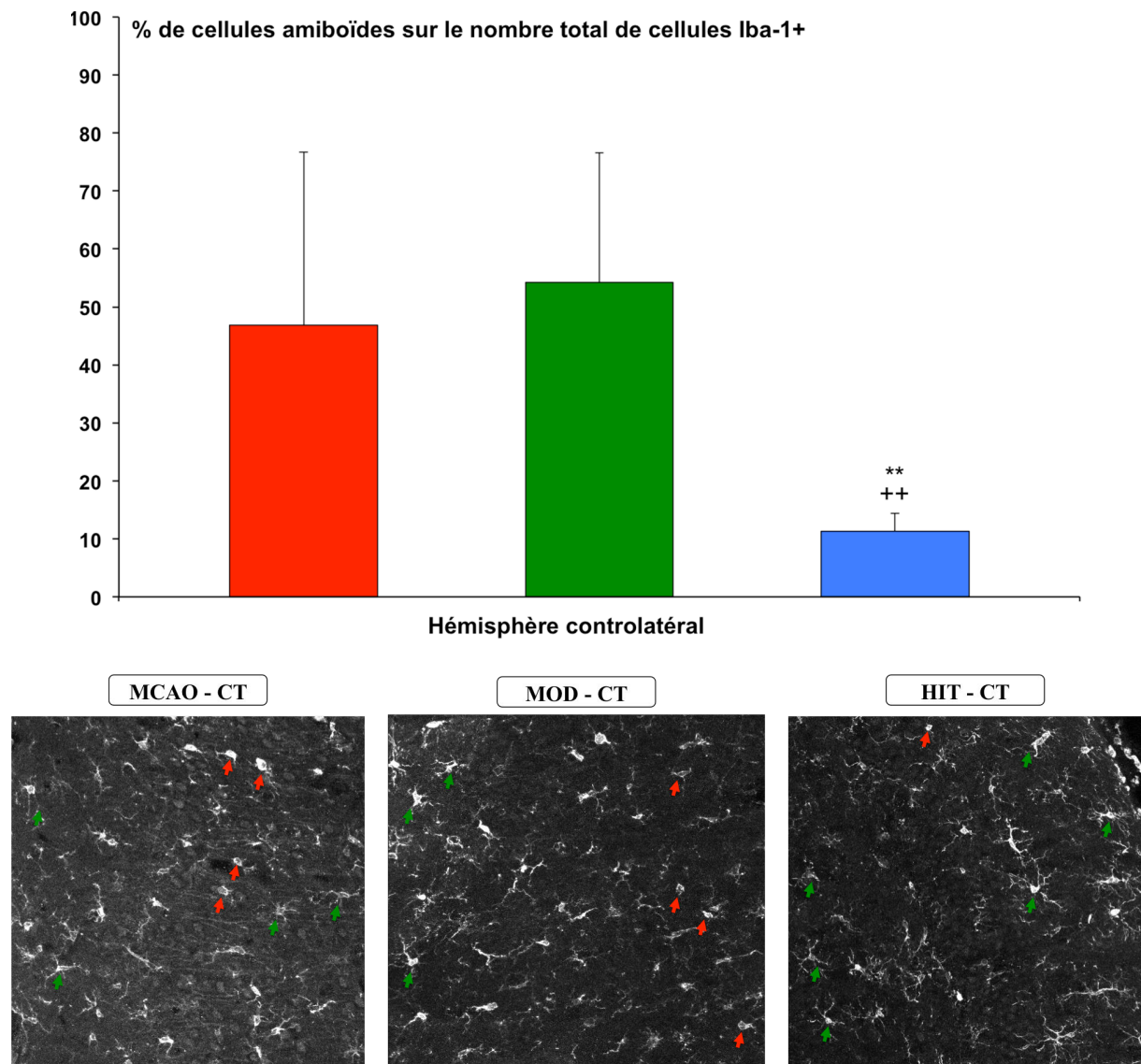
**Marquage Iba-1.** À J14, au niveau de l'hémisphère ipsilésionnel (n=6 pour chaque groupe), le nombre de cellules positives Iba-1 avec une morphologie amiboïde sur le nombre total de cellules positives Iba-1 est significativement inférieur chez les animaux du groupe HIT (20,6 %±5,2) par rapport au groupe MOD (74,9 %±29 ; p<0,01) et MCAO (77,1 %±31,5 ; p<0,001) (**Figure 3.23**).



**Figure 3.23 :** Marquage immunohistologique de la protéine Iba-1 au niveau péri-ischémique de l'hémisphère ipsilatéral. Pourcentage de cellules amiboïdes sur le nombre total de cellule Iba-1+ (en haut). Le % de cellules amiboïdes par rapport au nombre totale de cellules Iba-1+ est inférieure dans le groupe HIT par rapport au groupe MCAO (+ ; p<0,001) et au groupe MOD (\* ; p<0,01). **Illustration des différentes formes microgliales réactives entre les groupes lésés (en bas).** Les groupes MOD et MCAO comportent davantage de cellules amiboïdes (flèches rouges) que le groupe HIT. Les flèches vertes représentent les formes microgliales ramifiées.

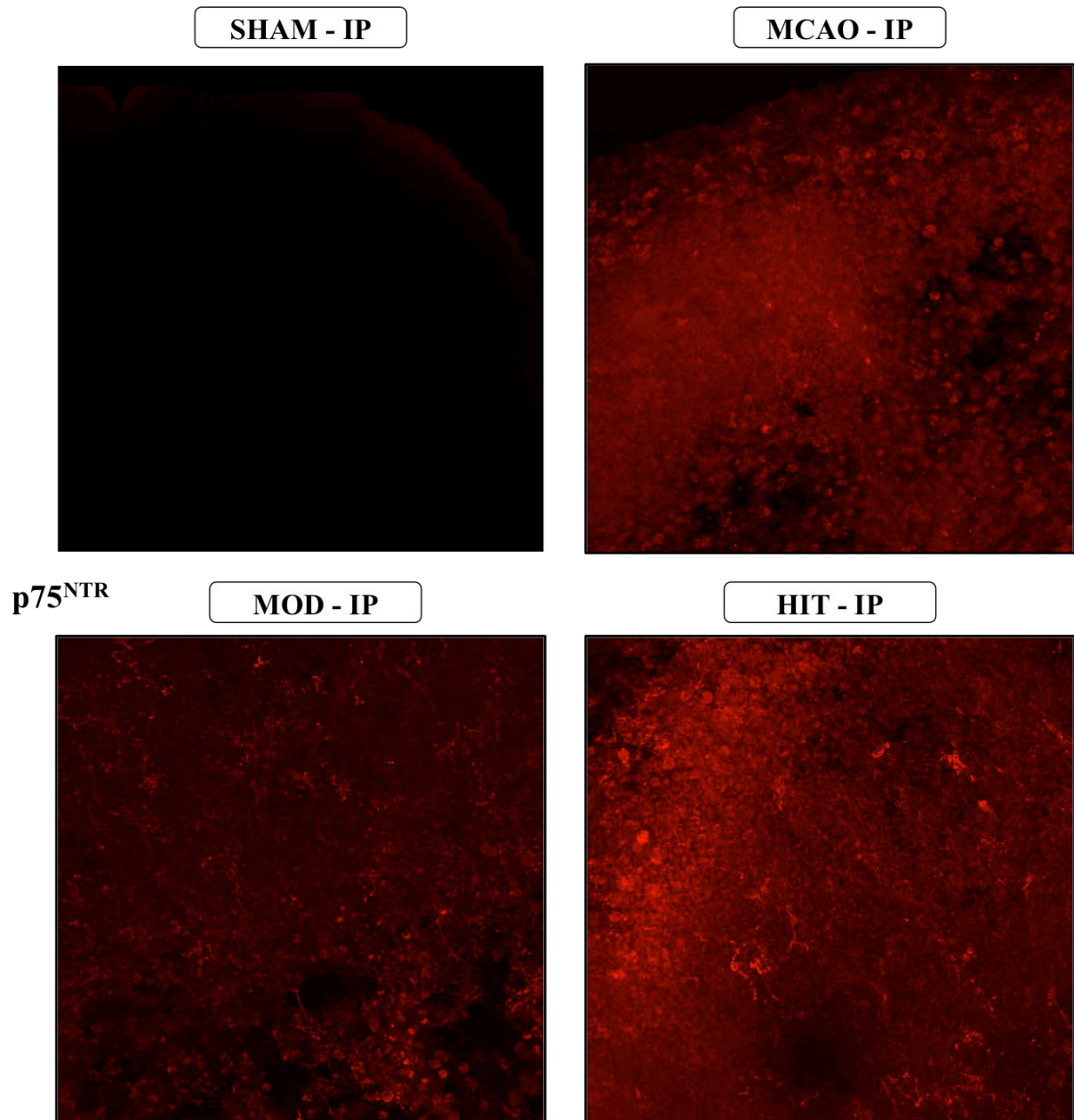


De même, au niveau de l'hémisphère controlésionnel, le nombre de cellules positives Iba-1 dont la morphologie est amiboïde est significativement inférieur chez les animaux du groupe HIT (11,3 %±3,1) sur le nombre total de cellules positives Iba-1 par rapport au groupe MOD (54,3 %±22,2 ;  $p<0,01$ ) et MCAO (46,9 %±29,9 ;  $p<0,01$ ) (**Figure 3.24**).



**Figure 3.24 :** Marquage immunohistologique de la protéine Iba-1 au niveau de l'hémisphère controlésionnel. Pourcentage de cellules amiboïdes sur le nombre total de cellule Iba-1+ (en haut). Le % de cellules amiboïdes par rapport au nombre totale de cellules Iba-1+ est inférieure dans le groupe HIT par rapport au groupe MCAO (+ ;  $p<0,01$ ) et au groupe MOD (\* ;  $p<0,01$ ). Illustration des différentes formes microgliales réactives entre les groupes lésés (en bas). Les groupes MOD et MCAO comportent davantage de cellules amiboïdes (flèches rouges) que le groupe HIT. Les flèches vertes représentent les formes microgliales ramifiées.

*Marquage p75<sup>NTR</sup>*. De manière qualitative, le marquage immunohistologique de p75<sup>NTR</sup> indique que les cellules des tissus lésés des groupes MCAO, MOD et HIT expriment bien cette protéine à l'inverse du groupe SHAM (**Figure 3.25**). Ceci est confirmé par les mesures réalisées par Western Blotting (voir ci-dessous).



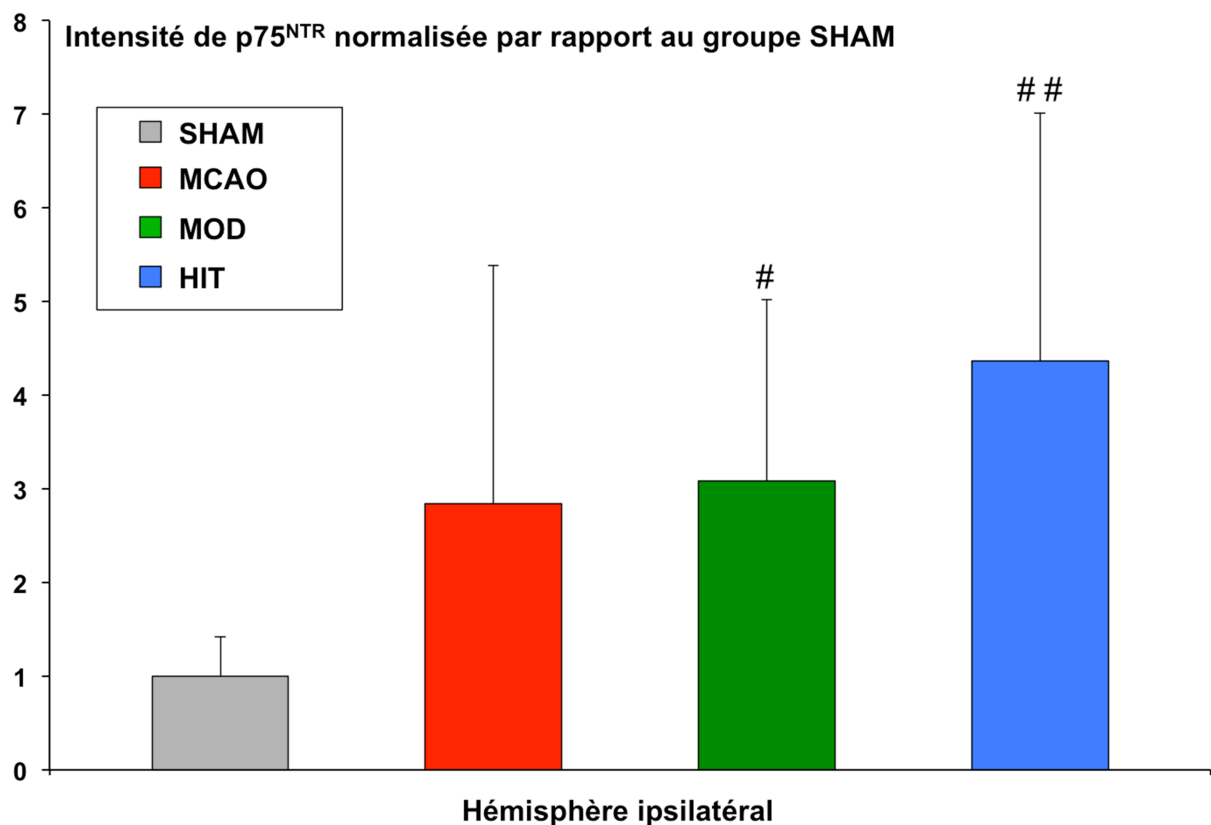
**Figure 3.25** : Exemple de marquage immunohistologique de la protéine p75<sup>NTR</sup> au niveau ipsilatéral à la lésion. L'ensemble des groupes lésés semble exprimer la protéine p75<sup>NTR</sup> (en rouge) contrairement au groupe SHAM.

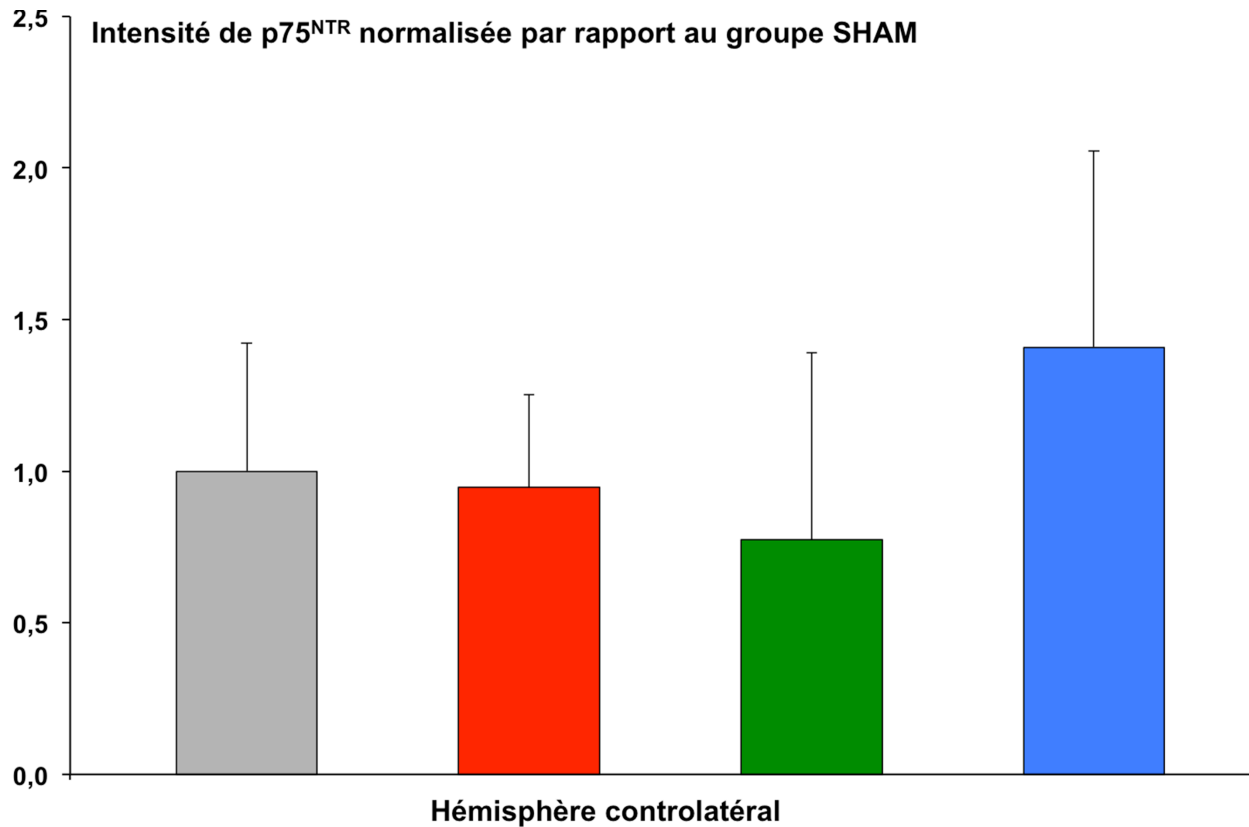
*Western Blotting*

**Intensité de p75<sup>NTR</sup> normalisée par rapport au groupe SHAM.** L'expression relative de p75<sup>NTR</sup> dans l'hémisphère ipsilatéral du groupe HIT (+ 336,5 % ; p<0,01) et du groupe MOD (+ 208,4 % ; p<0,05) est significativement supérieure à celle du groupe SHAM contrairement aux groupes MCAO (+ 183,8 %). En revanche, l'expression relative de p75<sup>NTR</sup> n'est pas différente entre les groupes lésés (n=4 pour chaque groupe).

Par ailleurs, l'expression relative de p75<sup>NTR</sup> dans l'hémisphère controlatéral n'est pas différente entre les groupes SHAM, MCAO (- 5,4 %), MOD (- 22,7 %) et HIT (+ 40,9 %)

(Figure 3.26).

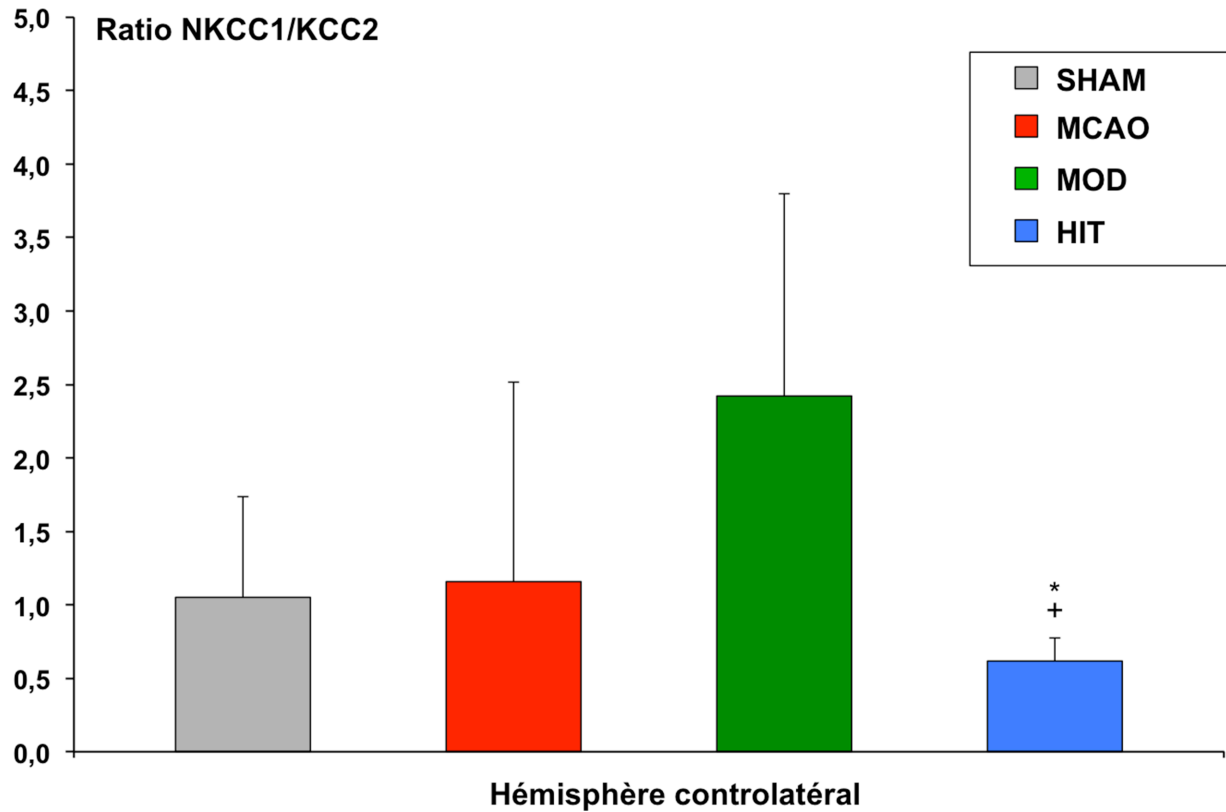




**Figure 3.26 :** Intensité de la protéine p75<sup>NTR</sup> normalisée à celle du groupe SHAM dans les 2 hémisphères. # indique une augmentation significative de l'expression de p75<sup>NTR</sup> dans les groupes HIT et MOD par rapport au groupe SHAM au niveau de l'hémisphère ipsilatéral.

**Ratio entre l'expression de NKCC1 par rapport à l'expression de KCC2.** Au niveau de l'hémisphère ipsilatéral, aucune différence n'est relevée pour les ratios NKCC1/KCC2 entre les groupes MCAO (2,20±1,46), MOD (4,23±5,16), HIT (1,75±0,89) et SHAM (1,05±0,68) (*graphique non présenté*).

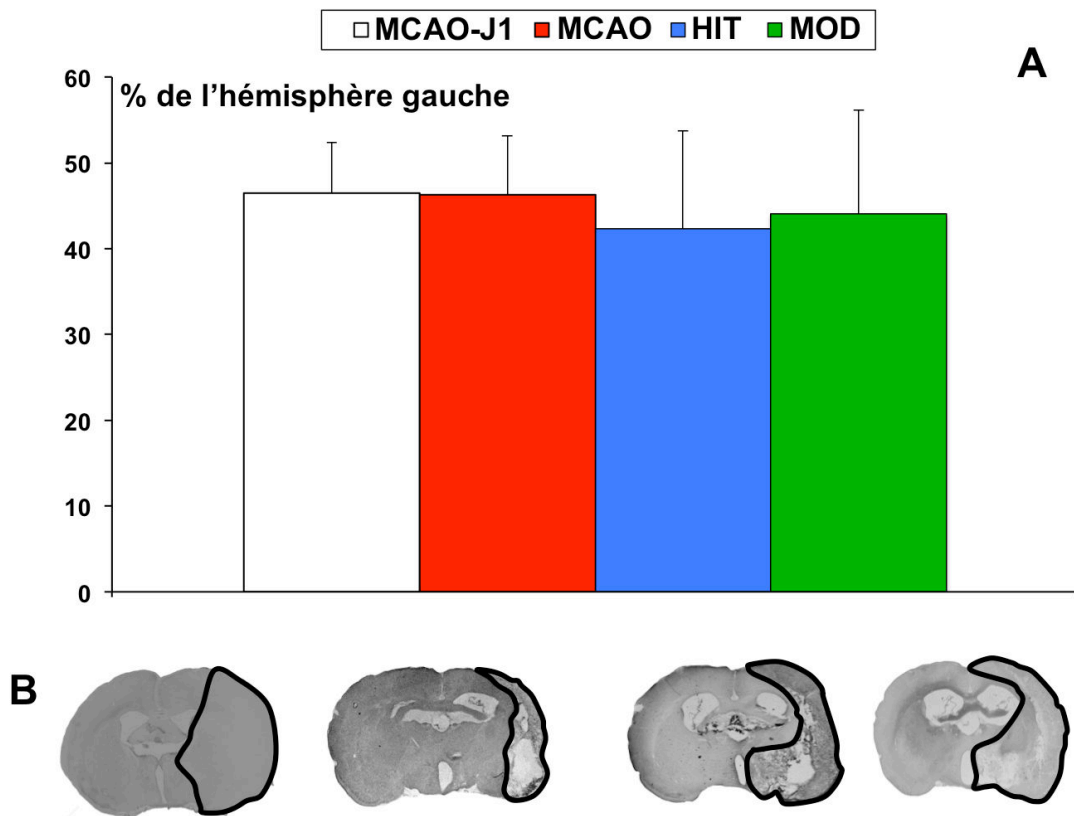
Le ratio NKCC1/KCC2 du groupe HIT (0,62±0,16) est significativement inférieur à celui des groupes MCAO (1,16±1,36 ; p<0,05) et MOD (2,42±1,38 ; p<0,05) au niveau de l'hémisphère controlatéral (n=4 pour chaque groupe) (**Figure 3.27**).



**Figure 3.27 :** Ratio entre l'expression de NKCC1 par rapport à l'expression de KCC2. \* Indique que le ratio NKCC1/KCC2 est significativement inférieur dans le groupe HIT par rapport au groupe MOD. + Indique que le ratio NKCC1/KCC2 est significativement inférieur dans le groupe HIT par rapport au groupe MCAO.

*Coloration au crésyl violet*

La taille de la lésion cérébrale des animaux des groupes MCAO-J1, MCAO, HIT et MOD représente respectivement 25,0±3,0 %, 23,0±3,0 %, 21,0±6,0 % et 22,0±6,0 % sur des coupes coronales totales (Figure 3.28). Aucune différence entre les groupes n'est observée. De plus, le faible écart-type de la surface de lésion des animaux du groupe MCAO-J1 semble indiquer que la sévérité de la lésion est reproductible d'un animal à un autre (n=7 pour chaque groupe).



**Figure 3.28 :** Taille de la lésion avant et après l'entraînement. **A)** La taille de la lésion est exprimée en pourcentage de l'hémisphère droit. **B)** Exemples représentatifs de coupes de cerveau colorées au crésyl violet illustrant une zone de lésion (délimitées en noires). De gauche à droite : MCAO-DI, HIT, MOD et MCAO.

### ***5.4 Discussion de l'étude n°3***

Cette étude montre que le programme HIT semble plus efficace que le programme MOD pour améliorer la performance d'endurance car les améliorations de la  $V_{SL}$  et de la  $V_{max}$  sont supérieures après le programme HIT par rapport au programme MOD. De plus, les HIT induisent une récupération complète de la force de préhension mais les autres paramètres fonctionnels restent perturbés. À partir des marqueurs de neuroplasticité utilisés, nos résultats à J14 indiquent que les HIT peuvent 1) influencer la morphologie de la microglie (et/ou macrophages circulants) dans les 2 hémisphères ce qui sous-tend une modification de la fonction de ces cellules gliales, 2) augmenter l'expression de  $p75^{NTR}$  (pour les MOD également) et 3) modifier le rapport NKCC1/KCC2 dans l'hémisphère controlatéral. Ces résultats suggèrent que les hautes intensités d'exercice peuvent agir sur la plasticité synaptique.

### ***Considérations méthodologiques sur les programmes d'endurance***

L'individualisation des intensités à partir de la  $V_{SL}$  a permis de cerner les vitesses de courses considérées comme élevées ( $> 25$  m/min) et modérées ( $< 20$  m/min) pour des rats ayant subi une ischémie cérébrale. Ceci est en désaccord avec les études précédentes qui considèrent par exemple qu'une vitesse fixée à 10 ou 13 m/min est suffisamment intense pour des rats MCAo-r ou alors qu'une vitesse de 20 m/min pour des HIT est appropriée sur des rats hypertendus (Choe *et al.*, 2006; Matsuda *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013b). Notre étude démontre que l'entraînement basé sur la  $V_{SL}$  a pu débuter dès le 2<sup>ème</sup> jour sans induire d'effets délétères sur la récupération. Cette période (entre J1 et J5) est même considérée comme la plus propice pour optimiser la récupération fonctionnelle chez le rat (Høydal *et al.*, 2007). En revanche, il a été montré qu'une rééducation/entraînement débutant avant les 24 h post-ischémique pouvait avoir des effets délétères sur la récupération (Risedal *et al.*, 1999). De

même, lorsque l'entraînement est initié tardivement (> 5 jours post-ischémie), la récupération des fonctions motrices peut être plus lente (Høydal *et al.*, 2007). Dans la présente étude, la durée de l'entraînement couvre la période la plus propice à la plasticité cérébrale chez le rongeur (= la fenêtre de plasticité), c'est-à-dire pendant les 15 premiers jours post-ischémique (Murphy & Corbett, 2009). Il semble nécessaire d'ajouter que l'initiation d'un programme d'endurance est différente chez les patients AVC (*i.e.* période équivalente  $\approx$  15-80 jours). Ainsi, nos résultats ne suggèrent pas que les HIT doivent être effectués dans les 2 premières semaines suivant un AVC. Néanmoins, ce mode d'exercice est faisable pendant la phase subaiguë chez les patients AVC modérés (Duncan *et al.*, 2003).

Par ailleurs, il a été suggéré que les mesures de lactate sanguin pouvaient induire une diminution de la concentration d'hémoglobine et donc affecter les performances d'endurance (Høydal *et al.*, 2007). Cependant, nos résultats complémentaires montrent que la performance maximale n'est pas affectée par le prélèvement régulier de sang veineux. La lactatémie de récupération mesurée 2 min après la fin de l'épreuve d'effort n'est pas impactée par la rééducation. De part la variabilité des valeurs obtenues, nous suggérons que ce paramètre n'est pas pertinent pour évaluer les effets des programmes d'endurance chez des animaux lésés, ce qui est en accord avec une étude réalisée chez la souris (Billat, 2005).

***Le programme HIT induit une récupération complète de la force de préhension mais n'affecte pas les autres paramètres fonctionnels de l'étude.***

Dans un premier temps, les déficits de force de préhension affectant la patte antérieure gauche confirment ceux de notre étude précédente (Pin-Barre *et al.*, 2014). La présente étude rajoute que ces déficits perdurent jusqu'à J14 sans montrer de récupération spontanée significative. La diminution de la force observée J7 et surtout J14 pourrait être liée à une altération du recrutement motoneuronal et/ou à une atrophie musculaire. Nous suggérons



également que cela pourrait être associé à une perte de la sensibilité mécanique car les animaux n'arrivent toujours pas à agripper correctement la barre à J14. Cette étude indique que le programme HIT assure une récupération complète de la force de la patte antérieure lésée dès le 7<sup>ème</sup> jour. Étant donné que la vitesse de course se situe au-dessus de la  $V_{SL}$ , le recrutement des cellules musculaires glycolytiques au cours de l'exercice devrait être supérieur à celui de l'exercice modéré (Gibala *et al.*, 2006). Ainsi, l'exercice HIT pourrait induire une facilitation du recrutement des unités motrices rapides et/ou une moindre diminution de la surface de section des cellules musculaires de type II (induite rapidement après l'ischémie cérébrale). Ceci pourrait donc influencer la récupération de la force mais plusieurs preuves sont nécessaires pour appuyer cette hypothèse (Boyne *et al.*, 2013). L'absence d'effet bénéfique du programme MOD sur la force musculaire pourrait être expliquée par la sollicitation majoritaire des cellules musculaires de type I au cours de ce type d'exercice qui assurent une production de force plus faible que les cellules musculaires de type II. Ce résultat est en accord avec des travaux antérieurs qui démontrent qu'un programme d'endurance classique n'améliore pas les fonctions sensorimotrices après ischémie cérébrale (Bateman *et al.*, 2001; Balaban *et al.*, 2011).

Cependant, notre étude rajoute que l'intensité du travail d'endurance (HIT ou MOD) n'agit pas davantage sur les tests de l'échelle et de la latéralisation de la lésion. Ceci suggère fortement que les programmes d'endurance doivent être couplés avec d'autres types d'exercices de rééducation afin d'optimiser l'ensemble des paramètres fonctionnels perturbés tels que des tâches motrices complexes (DeBow *et al.*, 2003).

### ***Les 2 programmes d'endurance corrigent l'hyperlactatémie observée à J14.***

Notre étude est la première à montrer une hyperlactatémie au repos 14 jours après l'ischémie cérébrale chez des animaux non-entraînés. Une hyperlactatémie dans la phase aiguë de l'AVC (<3 mois ; > 2 mmol/l) a également été observée sur 25 % des patients et semblait avoir des répercussions délétères sur la récupération fonctionnelle ainsi que sur le taux de mortalité (Jo *et al.*, 2012). Cette hyperlactatémie pourrait provenir de 2 sources. D'une part, l'augmentation des concentrations sanguines d'ACTH, de cortisol et de catécholamines induite par l'ischémie cérébrale peut influencer la production de lactate (Fujishima *et al.*, 1996; Anne *et al.*, 2007). D'autre part, plusieurs études ont démontré que l'hypoperfusion cérébrale peut également induire une augmentation de la glycolyse anaérobie dans les neurones altérés (Walz & Mukerji, 1988). Les 2 types d'exercices d'endurance testés induisent une diminution de la lactatémie à J14 car ces 2 programmes de rééducation peuvent améliorer le transport et la consommation de lactate au niveau musculaire de manière similaire malgré une différence de performance en faveur des HIT (Thomas *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2013).

### ***Les performances d'endurance sont affectées pendant les 14 jours du protocole.***

Notre étude a également permis de caractériser les altérations des paramètres d'endurance tels que la  $V_{SL}$  et la  $V_{max}$  induites par la MCAo-r. En effet, nos résultats indiquent que la  $V_{SL}$  est fortement diminuée dès le premier jour post-ischémie ce qui confirme ceux de la seule étude qui montre une diminution de la  $V_{SL}$  à J2 (Takahashi *et al.*, 2012). Cependant, la  $V_{SL}$  retrouve ses valeurs de base dès 7 jours après l'ischémie cérébrale dans cette étude alors que la  $V_{SL}$  reste fortement affectée à J14 pour les animaux non-entraînés dans notre étude. Au-delà des différences du protocole de l'épreuve incrémentale (incrémentations : 5 m/min et 1 min d'arrêt entre les paliers), ce résultat divergent peut être lié

au fait que la méthode d'ischémie utilisée provoque des déficits et une atrophie musculaire moins importants et persistants que ceux obtenus avec la MCAo-r (Takahashi et al., 2012). Très peu d'informations permettent d'expliquer une baisse du SL au cours de la phase aigüe post-ischémique. Néanmoins, nos résultats à J1 et à J14 reflètent une accumulation de lactate musculaire et sanguin visible à des intensités d'exercice plus faibles que les groupes contrôles indiquant un déséquilibre précoce entre capacité de production et de consommation du lactate. Cependant, il est suggéré que la baisse de la  $V_{SL}$  à J1 ne semble pas liée aux mêmes causes physiologiques qu'à J14. La baisse observée à J1 pourrait être essentiellement associée aux déficits sensorimoteurs qui peuvent affecter l'activité métabolique lors d'une épreuve de course (perturbation de l'économie de course) (Tang et al., 2008). En revanche, à J14, la diminution de la proportion des cellules musculaires oxydatives (type I), visible dès J7 chez le rat ayant subi la MCAo-r, pourrait également être une hypothèse valable pour expliquer la baisse de la  $V_{SL}$  (Choe et al., 2006). Étant donné qu'il n'y a pas d'amélioration significative de la  $V_{SL}$  chez les animaux non-entraînés jusqu'à J14, le recours aux programmes d'endurance semble donc justifié dans cette période de temps (Stoller et al., 2012).

#### ***Le programme HIT est plus efficace que le programme MOD pour améliorer les performances d'endurance des animaux lésés.***

Dans notre étude, les exercices de hautes intensités se révèlent plus efficaces pour améliorer l'aptitude aérobie à partir des paramètres d'endurance tels que la  $V_{SL}$  et la  $V_{max}$ . L'amélioration supérieure de la  $V_{SL}$  observée après les HIT est en accord avec les études qui montrent que les HIT induisent davantage d'effets supérieurs de la  $V_{SL}$ , ou du SV1, que les exercices MOD aussi bien chez des sujets sains (Laursen & Jenkins, 2002; Esfarjani & Laursen, 2007) que des patients ayant des troubles cardiovasculaires (Warburton et al., 2005). Il est établi chez le rat sain que les HIT augmentent la capacité oxydative des cellules

musculaires de type I et II suggérant que les mécanismes de consommation du lactate pourraient être plus efficaces à de plus hautes vitesses de course *via* une augmentation de la capacité aérobie musculaire (Hoshino *et al.*, 2013). Cependant, les répercussions des 2 programmes sur les adaptations musculaires ne sont pas encore identifiées dans le cadre de l'ischémie cérébrale ce qui permettrait de justifier cette hypothèse (voir Conclusion générale/perspectives). D'un point de vue fonctionnel et clinique, si le SL est observé à des intensités plus élevées, la fatigue induite par un exercice physique ou une tâche de la vie quotidienne devrait être diminuée. Les patients pourraient supporter plus facilement les charges de travail imposées dans les centres de réadaptation fonctionnelle et cela optimiserait la qualité de vie. De plus, la  $V_{SL}$  est considérée comme un paramètre prédictif pertinent de risques cardiovasculaires et prévenir d'éventuels risques de complications secondaires (Gitt, 2002). Ce paramètre physiologique devrait donc être davantage étudié pour clarifier les effets de programmes de rééducation/entraînement des patients AVC.

De nombreuses études chez le rat (sain et pathologique) indiquent que les HIT sont plus efficaces pour améliorer  $VO_{2max}$  que les MOD (Rognmo *et al.*, 2004; Holloway *et al.*, 2015; Ivey *et al.*, 2015). Cela est en accord avec ce que nous avons observé pour la  $V_{max}$  des animaux HIT par rapport à celle des MOD ( $\approx +57\%$  vs.  $\approx +33\%$  respectivement). Il est tout de même important de garder à l'esprit que  $V_{max}$  n'a pas la même signification physiologique que  $VO_{2max}$  puisqu'elle est atteinte à des intensités plus ou moins supérieures à celle de la limite maximale du système aérobie (Kemi *et al.*, 2005; Moreira *et al.*, 2013). Cependant, l'amélioration supérieure de  $V_{max}$  suite aux HIT pourrait être liée au fait que le potentiel aérobie est davantage exploité lors de ces exercices puisque les intensités permettraient d'être proche de  $VO_{2max}$  (ou de l'atteindre) pendant les exercices (Laursen & Jenkins, 2002; Buchheit & Laursen, 2013). Cependant, les MOD améliorent aussi  $VO_{2max}$  chez l'Homme et l'animal en augmentant aussi la proportion de cellules musculaires lentes, les stocks de

glycogène musculaire, le débit cardiaque et les débits sanguins musculaires et en optimisant l'économie de course (Høydal *et al.*, 2007; de Araujo *et al.*, 2013; Billinger *et al.*, 2014).

Les exercices HIT présentent donc plusieurs avantages pour les animaux hémiparétiques : les adaptations physiologiques sont plus efficaces et rapides bien que la durée des séances soit nettement inférieure (-49 % à -60 % dans notre étude) malgré une charge de travail équivalente comme cela a déjà été observé pour d'autres pathologies (Gibala *et al.*, 2006; Gibala & McGee, 2008). Ces résultats confirment que le HIT est bien une stratégie qui assure un gain de temps pour développer les capacités aérobies (Gibala *et al.*, 2006). Ce point est important car le manque de temps est le facteur limitant le plus cité expliquant le manque de pratique physique par les patients.

### ***Le volume lésionnel n'est pas modifié par l'entraînement.***

La taille de la lésion cérébrale ne semble pas modifier par les programmes d'endurance alors que la force de préhension (HIT seulement) et les paramètres d'endurance récupèrent de manière intéressante. Cette observation est en accord avec une étude précédente qui montre que la zone infarctée n'explique pas complètement la récupération des déficits observés indiquant la présence de mécanismes de plasticité dans les zones non-lésées (Risedal *et al.*, 1999; Murphy & Corbett, 2009). Il paraît intéressant de noter que les HIT n'augmentent pas le volume lésionnel comme cela aurait pu être suggéré, révélant ainsi que les hautes intensités de travail ne sont pas délétères et n'aggravent donc pas la lésion cérébrale.

### ***Le programme HIT module la neuroplasticité post-ischémique.***

À partir du marquage Iba-1, nos données indiquent que la microglie est toujours réactive dans les 2 hémisphères chez les animaux lésés, qu'ils soient entraînés ou non, ce qui reflète bien la présence d'une inflammation. Rappelons qu'il est impossible dans ces

conditions de distinguer la microglie résidente des monocytes/macrophages circulants avec le marquage Iba-1. Notre étude montre une activité inflammatoire au niveau controlésionnel ce qui n'est pas observé systématiquement (Ito *et al.*, 2001). Ceci est peut être lié à la sévérité de la lésion qui est différente dans notre étude (120 min contre 90 min pour Ito *et al.*) (Ito *et al.*, 2001).

La morphologie microgliale diffère entre les groupes d'animaux entraînés et non-entraînés. La forme amiboïde (ronde) est très importante chez les animaux non-entraînés et les animaux MOD (88% et 75 % des cellules Iba1 positives dans l'hémisphère lésé ainsi que 43 % et 50 % dans l'hémisphère controlatéral respectivement). Cette forme de microglie prend la fonction de phagocytes et peut sécréter des substances pro-inflammatoires et des radicaux libres, considérés comme délétères (phénotype M1). Il semblerait donc que l'intensité d'exercice ne soit pas suffisante dans le groupe MOD pour favoriser un changement significatif de morphologie de la microglie. Autrement dit, notre étude indique que l'intensité de travail sous le SL ne semble pas être la méthode la plus efficace pour lutter contre les effets délétères de l'inflammation au niveau cérébral.

En revanche, chez les animaux du groupe HIT, la microglie observée à J14 montre essentiellement une forme réactive ramifiée dans les 2 hémisphères (forme amiboïde de 20 % seulement au niveau ipsilatéral et 11% au niveau controlatéral). Ceci est en accord avec des études antérieures qui montrent que l'entraînement physique peut modifier la forme et donc la fonction de la microglie (Jensen & Yong, 2014). Cependant, la forme ramifiée peut exercer des rôles complètement opposés car elle peut soit induire une activité pro-inflammatoire (phénotype M1), donc délétère, soit une activité anti-inflammatoire (phénotype M2) et sécrétrice de neurotrophines, donc bénéfique (*cf. Chapitre III, section 1.1 - p.193*). Comme l'objectif était ici de déterminer dans un premier temps si l'intensité d'entraînement pouvait avoir des répercussions sur la forme de la microglie post-ischémique, les cytokines pro- et

anti-inflammatoires, caractéristiques des phénotypes M1 et M2, n'ont pas été mesurées. Il n'y a donc pas de preuves directes de la fonction de la microglie dans notre étude. Cependant, différents arguments nous permettent de suggérer que le phénotype M2 pourrait prédominer chez les animaux HIT. Il a été démontré que l'entraînement physique peut induire un transfert du phénotype M1 vers le phénotype M2 chez des animaux présentant divers pathologies neurodégénératives (Jensen & Yong, 2014; Svensson *et al.*, 2015). Ces résultats sont confirmés par une étude chez des souris saines indiquant que l'entraînement intense (26 m/min, 60 min, 10 % d'inclinaison) provoque une augmentation de la libération de cytokines anti-inflammatoires et une diminution des cytokines pro-inflammatoires (Wang *et al.*, 2012), ce qui est considéré comme favorable à la neuroprotection (Liesz *et al.*, 2009). Cela se traduit également par une diminution de la iNOS, de l'IL-1 $\beta$ , de TNF- $\alpha$  et de l'expression des TLR2 et TLR4, mais aussi par une augmentation de l'IGF-1 et de l'IL-10 (Jensen & Yong, 2014; Svensson *et al.*, 2015). De manière intéressante, la microglie réactive ramifiée, localisée dans la zone péri-ischémique, positive à la protéine Iba1, n'exprime pas l'antigène ED1<sup>1</sup> comme cela est le cas dans la microglie résidente (Ito *et al.*, 2001). Or, la microglie réactive ne présentant pas l'antigène ED1 est sécrétrice de plusieurs neurotrophines (Ito *et al.*, 1998).

Il est maintenant bien admis que l'entraînement en endurance favorise la sécrétion de neurotrophines, y compris pour les exercices de hautes intensités (Pin-Barre & Laurin, 2015). En effet, l'entraînement basé sur de hautes intensités chez le rat sain (95-100 % de la VO<sub>2max</sub>) permet d'induire de plus hautes concentrations de BDNF et de GDNF au niveau cérébral comparé à un entraînement MOD (80 % de la VO<sub>2max</sub>) (Afzalpour *et al.*, 2015). Pour étayer l'idée que les hautes intensités d'exercice favoriseraient la plasticité cérébrale en agissant sur l'action des neurotrophines, nous avons mesuré l'expression du récepteur p75 qui conditionne les fonctions cellulaires des neurotrophines (Meeker & Williams, 2015). Notre étude est la

---

<sup>1</sup> Marqueur de macrophage très présent dans les zones les plus atteintes par l'ischémie.

première où sont mesurés les effets de l'entraînement de différentes intensités sur l'expression de p75<sup>NTR</sup> dans les 2 hémisphères après une ischémie cérébrale sévère. Les HIT induisent une augmentation de p75<sup>NTR</sup> au niveau ipsilésionnel essentiellement. Nous pouvons déjà suggérer que les exercices de hautes intensités peuvent favoriser l'expression de p75<sup>NTR</sup> dans les 2 hémisphères. Cependant, l'expression de p75<sup>NTR</sup> peut révéler des rôles antagonistes qui font toujours débat et compliquent l'interprétation (Lu *et al.*, 2005). Il est en effet difficile dans notre étude de définir si l'expression de p75<sup>NTR</sup> est associée aux phénomènes de mort cellulaire ou, au contraire, à des effets favorables à la neuroplasticité. Néanmoins, plusieurs données de la littérature nous permettent de suggérer un effet bénéfique de cette augmentation de l'expression de p75<sup>NTR</sup>. Pour cela, rappelons dans un premier temps que l'augmentation de p75<sup>NTR</sup> dépend de la présence de BDNF et/ou des autres neurotrophines. Pour preuve, la suppression de BDNF (mature), par l'injection de TrkB-FC, inhibe l'augmentation de p75<sup>NTR</sup> après une axotomie ce qui diminue la survie neuronale (Shulga *et al.*, 2008, 2012). Après un entraînement en endurance sur des rats âgés, une seule étude a évalué l'expression de p75<sup>NTR</sup> et a fait le lien avec l'expression de BDNF (Vilela *et al.*, 2016). Il est indiqué que l'expression de p75<sup>NTR</sup> augmente après 8 semaines d'entraînement à 13-17 m/min et est associée à une augmentation du BDNF (il n'est pas possible de déterminer si l'intensité est modérée ou élevée dans cette étude). Les auteurs ont postulé que l'augmentation de l'expression de p75<sup>NTR</sup> pouvait favoriser la survie des neurones endommagés, déclencher l'apoptose pour éliminer les débris cellulaires et provoquer un environnement favorable à la repousse axonale et le contrôle de l'inflammation (Meeker & Williams, 2015). De nombreuses études indiquent que l'entraînement en endurance induit une augmentation de l'expression de BDNF (Pin-Barre & Laurin, 2015). De plus, cette augmentation est rapide car seulement sept jours d'entraînement consécutifs sont suffisants pour augmenter l'expression du BDNF et améliorer en parallèle la récupération motrice post-ischémique (Kokaia *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2000;



Kim *et al.*, 2005; Quirié *et al.*, 2012). Il est important de mentionner que l'entraînement stimule l'expression endogène de BDNF/TrkB dans les deux hémisphères, et tout particulièrement dans celui non-lésé, même par rapport aux animaux sains subissant le même programme (Kawamata *et al.*, 1996; Schäbitz *et al.*, 1997, 2000; Kiprianova *et al.*, 1999; Cupini *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2005; Ke *et al.*, 2011). Pour renforcer notre hypothèse sur le rôle potentiellement bénéfique de p75<sup>NTR</sup>, il est important de rajouter que l'endurance facilite la conversion du proBDNF vers le mBDNF pour différents types de populations (Ding *et al.*, 2010; Sartori *et al.*, 2011; Jensen & Yong, 2014). Il a été montré suite à une ischémie cérébrale induite par photothrombose qu'un entraînement en endurance de 7 jours favorise l'augmentation du taux de mBDNF et diminue le taux de proBDNF dans les régions peri-ischémiques et dans l'hippocampe au niveau ipsilatéral par rapport aux animaux sédentaires (Quirié *et al.*, 2012). À notre connaissance, l'inverse n'a jamais été observé. En fonction de ces arguments, nous suggérons donc que l'augmentation de p75<sup>NTR</sup> induite par le programme HIT reflèterait une augmentation de la libération de neurotrophines qui pourrait être bénéfique en termes de neuroplasticité (ce qui est en accord avec notre hypothèse concernant la microglie).

L'homéostasie du Cl<sup>-</sup> a été étudiée dans cette étude au travers de l'expression de KCC2 et NKCC1. Plusieurs études ont montré que cette neurotrophine pouvait favoriser l'expression de KCC2 au niveau du SNC traumatisé (Shulga *et al.*, 2008; Boulenguez *et al.*, 2010; Eftekhari *et al.*, 2016). Aucune étude ne s'est penchée sur le rôle de l'entraînement sur l'activité de ces co-transporteurs du Cl<sup>-</sup>, peut être parce que le rôle de la bumétanide (inhibiteur de NKCC1), traitement efficace pour contrecarrer l'inversion de l'expression de KCC2 et NKCC1 en cas de traumatisme ou d'ischémie cérébrale, a accaparé toute l'attention dans ce domaine (Xu *et al.*, 2016; Bhuiyan *et al.*, 2016). Il semblerait donc que l'entraînement intense suite à une ischémie cérébrale influencerait l'homéostasie du Cl<sup>-</sup>, pouvant jouer ainsi

sur la balance excitation – inhibition de l'activité neuronale, essentielle au bon fonctionnement du SNC. Nous postulons dans notre étude que le retour à un équilibre entre l'expression de NKCC1 et KCC2 au niveau de l'hémisphère controlésionnel chez les animaux HIT témoigne d'une plasticité synaptique induite par l'entraînement, en partie lié à l'action des neurotrophines et de la microglie.

### ***5.5 Conclusion et perspectives de l'étude n°3***

L'entraînement en endurance de type HIT a montré dans cette étude des résultats prometteurs pour la récupération post-ischémique malgré un temps de travail plus faible que les exercices traditionnels. Ces données remettent en question des recommandations actuelles en matière de pratiques d'activités physiques pour les patients AVC. Une telle stratégie permettrait de diminuer le volume de travail par séance, voir le temps de la période de rééducation, tout en augmentant ses effets bénéfiques sur la qualité de la vie. Nous suggérons donc que l'utilisation des HIT chez les patients AVC hémiparétiques est non seulement possible mais semble pertinente (Marzolini *et al.*, 2012; Boyne *et al.*, 2013; Bosch *et al.*, 2015). Cette étude renforce l'idée qu'optimiser les programmes d'endurance nécessite une approche à différents niveaux d'analyses et associant différents domaines de connaissances comme des mesures métaboliques issues de la physiologie de l'exercice, l'étude de la neuroplasticité (étage cellulaire) et une analyse comportementale. Cette étude met en évidence l'importance d'approfondir les effets des HIT sur la neuroplasticité car la différence entre les 2 programmes d'endurance a été observée à partir de nos marqueurs de plasticité pouvant refléter une amélioration de la récupération fonctionnelle. Nous verrons en perspectives de cette thèse que nos résultats nous ont permis de proposer des hypothèses qui ouvrent de nombreuses voies de recherche pouvant confirmer ou infirmer nos suggestions.

## Références

- Abe K (2000). Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1393–1408.
- Afzalpour ME, Chadorneshin HT, Foadoddini M & Eivari HA (2015). Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain. *Physiol Behav* **147**, 78–83.
- Andersberg G, Kokaia Z & Lindvall O (2001). Upregulation of p75 neurotrophin receptor after stroke in mice does not contribute to differential vulnerability of striatal neurons. *Exp Neurol* **169**, 351–363.
- Angelo MF, Aviles-Reyes RX, Villarreal A, Barker P, Reines AG & Ramos AJ (2009). p75 NTR expression is induced in isolated neurons of the penumbra after ischemia by cortical devascularization. *J Neurosci Res* **87**, 1892–1903.
- Anne M, Juha K, Timo M, Mikko T, Olli V, Kyösti S, Heikki H & Vilho M (2007). Neurohormonal activation in ischemic stroke: effects of acute phase disturbances on long-term mortality. *Curr Neurovasc Res* **4**, 170–175.
- de Araujo GG, Papoti M, Delbin MA, Zanesco A & Gobatto CA (2013). Physiological adaptations during endurance training below anaerobic threshold in rats. *Eur J Appl Physiol* **113**, 1859–1870.
- Arya KN, Pandian S, Verma R & Garg RK (2011). Movement therapy induced neural reorganization and motor recovery in stroke: a review. *J Bodyw Mov Ther* **15**, 528–537.
- Askim T, Dahl AE, Aamot IL, Hokstad A, Helbostad J & Indredavik B (2014). High-intensity aerobic interval training for patients 3-9 months after stroke: a feasibility study. *Physiother Res Int J Res Clin Phys Ther* **19**, 129–139.
- Balaban B, Tok F, Yavuz F, Yaşar E & Alaca R (2011). Early rehabilitation outcome in patients with middle cerebral artery stroke. *Neurosci Lett* **498**, 204–207.
- Banks G, Bernhardt J, Churilov L & Cumming TB (2012). Exercise preferences are different after stroke. *Stroke Res Treat* **2012**, 890946.
- Bartlett JD, Close GL, MacLaren DPM, Gregson W, Drust B & Morton JP (2011). High-intensity interval running is perceived to be more enjoyable than moderate-intensity continuous exercise: Implications for exercise adherence. *J Sports Sci* **29**, 547–553.
- Bateman A, Culpan FJ, Pickering AD, Powell JH, Scott OM & Greenwood RJ (2001). The effect of aerobic training on rehabilitation outcomes after recent severe brain injury: A randomized controlled evaluation. *Arch Phys Med Rehabil* **82**, 174–182.
- Ben-Ari Y (2002). Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* **3**, 728–739.
- Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R & Khazipov R (2007). GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. *Physiol Rev* **87**, 1215–1284.
- Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT & Cherubini E (2012). The GABA Excitatory/Inhibitory Shift in Brain Maturation and Neurological Disorders. *The Neuroscientist* **18**, 467–486.
- Bentley DJ, Newell J & Bishop D (2007). Incremental exercise test design and analysis: implications for performance diagnostics in endurance athletes. *Sports Med Auckl NZ* **37**, 575–586.
- Berretta A, Tzeng Y-C & Clarkson AN (2014). Post-stroke recovery: the role of activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor. *Expert Rev Neurother* **14**, 1335–1344.
- Beynon SB & Walker FR (2012). Microglial activation in the injured and healthy brain: What are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology. *Neuroscience* **225**, 162–171.
- Bhuiyan MIH, Song S, Yuan H, Begum G, Kofler J, Kahle KT, Yang S-S, Lin S-H, Alper SL, Subramanya AR & Sun D (2016). WNK-Cab39-NKCC1 signaling increases the susceptibility to ischemic brain damage in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*; DOI: 10.1177/0271678X16675368.

- Billat VL (2005). Inter- and intrastain variation in mouse critical running speed. *J Appl Physiol* **98**, 1258–1263.
- Billinger SA, Arena R, Bernhardt J, Eng JJ, Franklin BA, Johnson CM, MacKay-Lyons M, Macko RF, Mead GE, Roth EJ, Shaughnessy M, Tang A & on behalf of the American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Lifestyle and Cardiometabolic Health, Council on Epidemiology and Prevention, and Council on Clinical Cardiology (2014). Physical Activity and Exercise Recommendations for Stroke Survivors: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **45**, 2532–2553.
- Billinger SA, Gajewski BJ, Guo LX & Kluding PM (2009). Single limb exercise induces femoral artery remodeling and improves blood flow in the hemiparetic leg poststroke. *Stroke J Cereb Circ* **40**, 3086–3090.
- Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C & Kaila K (2009). Cation-Chloride Cotransporters and Neuronal Function. *Neuron* **61**, 820–838.
- Bocquet V & Billat V (1999). Modèles mathématiques et physiologiques de la performance humaine. *Sci Sports* **14**, 278–291.
- Bosch PR, Holzapfel S & Traustadottir T (2015). Feasibility of Measuring Ventilatory Threshold in Adults With Stroke-Induced Hemiparesis: Implications for Exercise Prescription. *Arch Phys Med Rehabil* **96**, 1779–1784.
- Bosquet L, Léger L & Legros P (2002). Methods to determine aerobic endurance. *Sports Med Auckl NZ* **32**, 675–700.
- Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, Stil A, Darbon P, Cattaert D, Delpire E, Marsala M & Vinay L (2010). Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat Med* **16**, 302–307.
- Boyne P, Dunning K, Carl D, Gerson M, Khoury J & Kissela B (2013). High-Intensity Interval Training in Stroke Rehabilitation. *Top Stroke Rehabil* **20**, 317–330.
- Boyne P, Dunning K, Carl D, Gerson M, Khoury J, Rockwell B, Keeton G, Westover J, Williams A, McCarthy M & Kissela B (2016). High-Intensity Interval Training and Moderate-Intensity Continuous Training in Ambulatory Chronic Stroke: Feasibility Study. *Phys Ther* **96**, 1533–1544.
- Brito Vieira WH, Halsberghe MJE, Schwantes MLB, Perez SEA, Baldissera V, Prestes J, Prestes P, Farias DL & Parizotto NA (2014). Increased lactate threshold after five weeks of treadmill aerobic training in rats. *Braz J Biol Rev Brasileira Biol* **74**, 444–449.
- Buchheit M & Laursen PB (2013). High-Intensity Interval Training, Solutions to the Programming Puzzle: Part I: Cardiopulmonary Emphasis. *Sports Med* **43**, 313–338.
- Burgomaster KA, Howarth KR, Phillips SM, Rakobowchuk M, Macdonald MJ, McGee SL & Gibala MJ (2008). Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J Physiol* **586**, 151–160.
- Cai J, Hua F, Yuan L, Tang W, Lu J, Yu S, Wang X & Hu Y (2014). Potential Therapeutic Effects of Neurotrophins for Acute and Chronic Neurological Diseases. *BioMed Res Int* **2014**, 1–12.
- Carvalho JF, Masuda MO & Pompeu FAMS (2005). Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **140**, 409–413.
- Chamma I, Chevy Q, Poncer JC & Lévi S (2012). Role of the neuronal K-Cl co-transporter KCC2 in inhibitory and excitatory neurotransmission. *Front Cell Neurosci* **6**, 5.
- Cherry JD, Olschowka JA & O'Banion M (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation* **11**, 98.
- Choe M-A, An GJ, Lee Y-K, Im JH, Choi-Kwon S & Heitkemper M (2006). Effect of Early Low-Intensity Exercise on Rat Hind-Limb Muscles Following Acute Ischemic Stroke. *Biol Res Nurs* **7**, 163–174.
- Ciolac EG (2012). High-intensity interval training and hypertension: maximizing the benefits of exercise? *Am J Cardiovasc Dis* **2**, 102–110.
- Clarkson AN, Overman JJ, Zhong S, Mueller R, Lynch G & Carmichael ST (2011). AMPA Receptor-Induced Local Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling Mediates Motor Recovery after Stroke. *J Neurosci* **31**, 3766–3775.
- Cobianchi S, Arbat-Plana A, López-Álvarez V & Navarro X (2016). Neuroprotective effects of exercise

- treatments after injury: the dual role of neurotrophic factors. *Curr Neuropharmacol* **14**, 1–1.
- Conley DL & Krahenbuhl GS (1980). Running economy and distance running performance of highly trained athletes. *Med Sci Sports Exerc* **12**, 357–360.
- Constans A, Pin-barre C, Temprado J-J, Decherchi P & Laurin J (2016). Influence of Aerobic Training and Combinations of Interventions on Cognition and Neuroplasticity after Stroke. *Front Aging Neurosci*; DOI: 10.3389/fnagi.2016.00164.
- Costill DL, Flynn MG, Kirwan JP, Houmard JA, Mitchell JB, Thomas R & Park SH (1988). Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance. *Med Sci Sports Exerc* **20**, 249–254.
- Côté M-P, Gandhi S, Zambrotta M & Houlé JD (2014). Exercise modulates chloride homeostasis after spinal cord injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **34**, 8976–8987.
- Cupini LM, Diomedi M, Placidi F, Silvestrini M & Giacomini P (2001). Cerebrovascular Reactivity and Subcortical Infarctions. *Arch Neurol*; DOI: 10.1001/archneur.58.4.577.
- Danglot L, Triller A & Marty S (2006). The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus* **16**, 1032–1060.
- Danielsson A, Willén C & Sunnerhagen KS (2007). Measurement of energy cost by the physiological cost index in walking after stroke. *Arch Phys Med Rehabil* **88**, 1298–1303.
- DeBow SB, Davies MLA, Clarke HL & Colbourne F (2003). Constraint-Induced Movement Therapy and Rehabilitation Exercises Lessen Motor Deficits and Volume of Brain Injury After Striatal Hemorrhagic Stroke in Rats. *Stroke* **34**, 1021–1026.
- Dechant G & Barde Y-A (2002). The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* **5**, 1131–1136.
- Dekoninck Y (2007). Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Curr Opin Pharmacol* **7**, 93–99.
- Ding G, Jiang Q, Li L, Zhang L, Wang Y, Zhang ZG, Lu M, Panda S, Li Q, Ewing JR & Chopp M (2010). Cerebral tissue repair and atrophy after embolic stroke in rat: A magnetic resonance imaging study of erythropoietin therapy. *J Neurosci Res* **88**, 3206–3214.
- Du J, Feng L, Yang F & Lu B (2000). Activity- and Ca(2+)-dependent modulation of surface expression of brain-derived neurotrophic factor receptors in hippocampal neurons. *J Cell Biol* **150**, 1423–1434.
- Duncan P, Studenski S, Richards L, Gollub S, Lai SM, Reker D, Perera S, Yates J, Koch V, Rigler S & Johnson D (2003). Randomized clinical trial of therapeutic exercise in subacute stroke. *Stroke J Cereb Circ* **34**, 2173–2180.
- Eftekhari S, Mehrabi S, Karimzadeh F, Joghataei M, Khaksarian M, Hadjighassem M, Katebi M & Soleimani M (2016). Brain Derived Neurotrophic Factor Modification of Epileptiform Burst Discharges in a Temporal Lobe Epilepsy Model. *Basic Clin Neurosci J*; DOI: 10.15412/J.BCN.03070205.
- E L, Burns JM & Swerdlow RH (2014). Effect of high-intensity exercise on aged mouse brain mitochondria, neurogenesis, and inflammation. *Neurobiol Aging* **35**, 2574–2583.
- Eng JJ, Dawson AS & Chu KS (2004). Submaximal exercise in persons with stroke: test-retest reliability and concurrent validity with maximal oxygen consumption. *Arch Phys Med Rehabil* **85**, 113–118.
- Enzinger C, Dawes H, Johansen-Berg H, Wade D, Bogdanovic M, Collett J, Guy C, Kischka U, Ropele S, Fazekas F & Matthews PM (2009). Brain Activity Changes Associated With Treadmill Training After Stroke. *Stroke* **40**, 2460–2467.
- Esfarjani F & Laursen PB (2007). Manipulating high-intensity interval training: effects on VO<sub>2</sub>max, the lactate threshold and 3000 m running performance in moderately trained males. *J Sci Med Sport* **10**, 27–35.
- Faude O, Kindermann W & Meyer T (2009). Lactate threshold concepts: how valid are they? *Sports Med Auckl NZ* **39**, 469–490.
- Fujishima S, Abe I, Okada Y, Saku Y, Sadoshima S & Fujishima M (1996). Serial changes in blood pressure and neurohormone levels after the onset of lacunar stroke. *Angiology* **47**, 579–587.
- Fumagalli S, Peregó C, Pischiutta F, Zanier ER & De Simoni M-G (2015). The Ischemic Environment Drives Microglia and Macrophage Function. *Front Neurol*; DOI: 10.3389/fneur.2015.00081.
- Gaesser GA & Poole DC (1996). The slow component of oxygen uptake kinetics in humans. *Exerc Sport Sci Rev* **24**, 35–71.

- Gao Y, Zhao Y, Pan J, Yang L, Huang T, Feng X, Li C, Liang S, Zhou D, Liu C, Tu F, Tao C & Chen X (2014). Treadmill exercise promotes angiogenesis in the ischemic penumbra of rat brains through caveolin-1/VEGF signaling pathways. *Brain Res* **1585**, 83–90.
- Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe C-U, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E & Magnus T (2009). Temporal and Spatial Dynamics of Cerebral Immune Cell Accumulation in Stroke. *Stroke* **40**, 1849–1857.
- Gertz K, Priller J, Kronenberg G, Fink KB, Winter B, Schröck H, Ji S, Milosevic M, Harms C, Böhm M, Dirnagl U, Laufs U & Endres M (2006). Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow. *Circ Res* **99**, 1132–1140.
- Gibala MJ, Little JP, van Essen M, Wilkin GP, Burgomaster KA, Safdar A, Raha S & Tarnopolsky MA (2006). Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J Physiol* **575**, 901–911.
- Gibala MJ, Little JP, MacDonald MJ & Hawley JA (2012). Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease: Adaptations to low-volume, high-intensity interval training. *J Physiol* **590**, 1077–1084.
- Gibala MJ & McGee SL (2008). Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? *Exerc Sport Sci Rev* **36**, 58–63.
- Gitt AK (2002). Exercise Anaerobic Threshold and Ventilatory Efficiency Identify Heart Failure Patients for High Risk of Early Death. *Circulation* **106**, 3079–3084.
- Gjellesvik TI, Brurok B, Hoff J, Tørhaug T & Helgerud J (2012). Effect of high aerobic intensity interval treadmill walking in people with chronic stroke: a pilot study with one year follow-up. *Top Stroke Rehabil* **19**, 353–360.
- Globas C, Becker C, Cerny J, Lam JM, Lindemann U, Forrester LW, Macko RF & Luft AR (2012). Chronic Stroke Survivors Benefit From High-Intensity Aerobic Treadmill Exercise: A Randomized Control Trial. *Neurorehabil Neural Repair* **26**, 85–95.
- Gordon NF (2004). Physical Activity and Exercise Recommendations for Stroke Survivors: An American Heart Association Scientific Statement From the Council on Clinical Cardiology, Subcommittee on Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention; the Council on Cardiovascular Nursing; the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; and the Stroke Council. *Stroke* **35**, 1230–1240.
- Greenberg DA & Jin K (2013). Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. *Cell Mol Life Sci CMLS* **70**, 1753–1761.
- Hailer NP (2008). Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: It is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Prog Neurobiol* **84**, 211–233.
- Hansen TM, Moss AJ & Brindle NPJ (2008). Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in neurovascular regeneration and protection following stroke. *Curr Neurovasc Res* **5**, 236–245.
- Helgerud J, Høydal K, Wang E, Karlsen T, Berg P, Bjerkaas M, Simonsen T, Helgesen C, Hjørth N, Bach R & Hoff J (2007). Aerobic high-intensity intervals improve VO<sub>2</sub>max more than moderate training. *Med Sci Sports Exerc* **39**, 665–671.
- Hermann DM & Zechariah A (2009). Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**, 1620–1643.
- Hoehn BD, Palmer TD & Steinberg GK (2005). Neurogenesis in Rats After Focal Cerebral Ischemia is Enhanced by Indomethacin. *Stroke* **36**, 2718–2724.
- Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Simpson JA, Quadriatero J & Spriet LL (2015). High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. *PLoS One* **10**, e0121138.
- Hopker JG, Jobson SA & Pandit JJ (2011). Controversies in the physiological basis of the “anaerobic threshold” and their implications for clinical cardiopulmonary exercise testing. *Anaesthesia* **66**, 111–123.
- Horowitz J, Sidossis L & Coyle E (1994). High Efficiency of Type I Muscle Fibers Improves Performance. *Int J Sports Med* **15**, 152–157.
- Hoshino D, Yoshida Y, Kitaoka Y, Hatta H & Bonen A (2013). High-intensity interval training increases intrinsic rates of mitochondrial fatty acid oxidation in rat red and white skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* **38**, 326–333.
- Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ & Ellingsen Ø (2007). Running speed and maximal oxygen uptake in

- rats and mice: practical implications for exercise training: *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* **14**, 753–760.
- Hübner CA, Stein V, Hermans-Borgmeyer I, Meyer T, Ballanyi K & Jentsch TJ (2001). Disruption of KCC2 Reveals an Essential Role of K-Cl Cotransport Already in Early Synaptic Inhibition. *Neuron* **30**, 515–524.
- Hu X, Leak RK, Shi Y, Suenaga J, Gao Y, Zheng P & Chen J (2014). Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nat Rev Neurol* **11**, 56–64.
- Irmady K, Jackman KA, Padow VA, Shahani N, Martin LA, Cerchietti L, Unsicker K, Iadecola C & Hempstead BL (2014). Mir-592 regulates the induction and cell death-promoting activity of p75NTR in neuronal ischemic injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **34**, 3419–3428.
- Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T & Fukuuchi Y (2001). Enhanced Expression of Iba1, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain. *Stroke* **32**, 1208–1215.
- Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, Donatelli I, Kida H, Paulson JC, Webster RG & Kawaoka Y (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* **72**, 7367–7373.
- Ivey FM, Hafer-Macko CE, Ryan AS & Macko RF (2010). Impaired leg vasodilatory function after stroke: adaptations with treadmill exercise training. *Stroke J Cereb Circ* **41**, 2913–2917.
- Ivey FM, Macko RF, Ryan AS & Hafer-Macko CE (2005). Cardiovascular health and fitness after stroke. *Top Stroke Rehabil* **12**, 1–16.
- Ivey FM, Ryan AS, Hafer-Macko CE & Macko RF (2011). Improved Cerebral Vasomotor Reactivity After Exercise Training in Hemiparetic Stroke Survivors. *Stroke* **42**, 1994–2000.
- Ivey FM, Stookey AD, Hafer-Macko CE, Ryan AS & Macko RF (2015). Higher Treadmill Training Intensity to Address Functional Aerobic Impairment after Stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc* **24**, 2539–2546.
- Jaenisch N, Witte OW & Frahm C (2010). Downregulation of Potassium Chloride Cotransporter KCC2 After Transient Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* **41**, e151–e159.
- Jafari A, Faizi MAH, Askarian F & Pourrazi H (2009). Effect of regular aerobic exercise with ozone exposure on peripheral leukocyte populations in Wistar male rats. *J Res Med Sci Off J Isfahan Univ Med Sci* **14**, 277–283.
- Jensen SK & Yong VW (2014). Microglial modulation as a mechanism behind the promotion of central nervous system well-being by physical exercise. *Clin Exp Neuroimmunol* **5**, 188–201.
- Jones A (2006). The Physiology of the World Record Holder for the Women’s Marathon. *Int J Sports Sci Coach* **1**, 101–116.
- Jones AM & Burnley M (2009). Oxygen uptake kinetics: an underappreciated determinant of exercise performance. *Int J Sports Physiol Perform* **4**, 524–532.
- Jo S, Jeong T, Lee JB, Jin YH, Yoon J, Jun YK & Park B (2012). Initial hyperlactatemia in the ED is associated with poor outcome in patients with ischemic stroke. *Am J Emerg Med* **30**, 449–455.
- Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M & Voipio J (2014). Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* **15**, 637–654.
- Karperien A, Ahammer H & Jelinek HF (2013). Quantitating the subtleties of microglial morphology with fractal analysis. *Front Cell Neurosci*; DOI: 10.3389/fncel.2013.00003.
- Katz-Leurer M, Shochina M, Carmeli E & Friedlander Y (2003). The influence of early aerobic training on the functional capacity in patients with cerebrovascular accident at the subacute stage. No commercial party having a direct financial interest in the results of the research supporting this article has or will confer a benefit upon the author(s) or upon any organization with which the author(s) is/are associated. *Arch Phys Med Rehabil* **84**, 1609–1614.
- Kawamata T, Alexis NE, Dietrich WD & Finklestein SP (1996). Intracisternal basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances behavioral recovery following focal cerebral infarction in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* **16**, 542–547.
- Kemi OJ, Haram PM, Loennechen JP, Osnes J-B, Skomedal T, Wisløff U & Ellingsen Ø (2005). Moderate vs. high exercise intensity: differential effects on aerobic fitness, cardiomyocyte contractility, and endothelial function. *Cardiovasc Res* **67**, 161–172.

- Kessler HS, Sisson SB & Short KR (2012). The Potential for High-Intensity Interval Training to Reduce Cardiometabolic Disease Risk: *Sports Med* **42**, 489–509.
- Ke Z, Yip SP, Li L, Zheng X-X & Tong K-Y (2011). The Effects of Voluntary, Involuntary, and Forced Exercises on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Motor Function Recovery: A Rat Brain Ischemia Model ed. Combs C. *PLoS ONE* **6**, e16643.
- Kim H-J, Cho M-H, Shim WH, Kim JK, Jeon E-Y, Kim D-H & Yoon S-Y (2016). Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Mol Psychiatry*; DOI: 10.1038/mp.2016.103.
- Kim M-W, Bang M-S, Han T-R, Ko Y-J, Yoon B-W, Kim J-H, Kang L-M, Lee K-M & Kim M-H (2005). Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Res* **1052**, 16–21.
- Kiprianova I, Sandkühler J, Schwab S, Hoyer S & Spranger M (1999). Brain-derived neurotrophic factor improves long-term potentiation and cognitive functions after transient forebrain ischemia in the rat. *Exp Neurol* **159**, 511–519.
- Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, Hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, Hirakawa A, Takeuchi H, Suzumura A, Ishiguro N & Kadomatsu K (2013). Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death Dis* **4**, e525.
- Kokaia Z, Andsberg G, Martinez-Serrano A & Lindvall O (1998). Focal cerebral ischemia in rats induces expression of P75 neurotrophin receptor in resistant striatal cholinergic neurons. *Neuroscience* **84**, 1113–1125.
- Kokaia Z, Zhao Q, Kokaia M, Elmér E, Metsis M, Smith ML, Siesjö BK & Lindvall O (1995). Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp Neurol* **136**, 73–88.
- Kourdougli N, Pellegrino C, Renko J-M, Khirug S, Chazal G, Kukko-Lukjanov T-K, Lauri SE, Gaiarsa J-L, Zhou L, Peret A, Castrén E, Tuominen RK, Crépel V & Rivera C (2017). Depolarizing GABA contributes to glutamatergic network rewiring in epilepsy: GABA fosters glutamatergic rewiring. *Ann Neurol*; DOI: 10.1002/ana.24870.
- Kriz J & Lalancette-Hébert M (2009). Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol (Berl)* **117**, 497–509.
- Kurien B & Scofield R (2006). Western blotting. *Methods* **38**, 283–293.
- Kwakkell G, van Peppen R, Wagenaar RC, Wood Dauphinee S, Richards C, Ashburn A, Miller K, Lincoln N, Partridge C, Wellwood I & Langhorne P (2004). Effects of Augmented Exercise Therapy Time After Stroke: A Meta-Analysis. *Stroke* **35**, 2529–2539.
- Lacour JR, Bouvat E & Barthomy JC (1990). Post-competition blood lactate concentrations as indicators of anaerobic energy expenditure during 400-m and 800-m races. *Eur J Appl Physiol* **61**, 172–176.
- Lam JM, Globas C, Cerny J, Hertler B, Uludag K, Forrester LW, Macko RF, Hanley DF, Becker C & Luft AR (2010). Predictors of Response to Treadmill Exercise in Stroke Survivors. *Neurorehabil Neural Repair* **24**, 567–574.
- Laursen PB & Jenkins DG (2002). The scientific basis for high-intensity interval training: optimising training programmes and maximising performance in highly trained endurance athletes. *Sports Med Auckl NZ* **32**, 53–73.
- Lawson LJ, Perry VH & Gordon S (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **48**, 405–415.
- Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, Giese T & Veltkamp R (2009). Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* **15**, 192–199.
- Li L, Rong W, Ke Z, Hu X & Tong K-Y (2013). The effects of training intensities on motor recovery and gait symmetry in a rat model of ischemia. *Brain Inj* **27**, 408–416.
- Loane DJ & Byrnes KR (2010). Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics* **7**, 366–377.
- Lourbopoulos A, Ertürk A & Hellal F (2015). Microglia in action: how aging and injury can change the brain's guardians. *Front Cell Neurosci*; DOI: 10.3389/fncel.2015.00054.
- Lu B, Pang PT & Woo NH (2005). The yin and yang of neurotrophin action. *Nat Rev Neurosci* **6**, 603–614.
- Ludwig A, Li H, Saarma M, Kaila K & Rivera C (2003). Developmental up-regulation of KCC2 in the absence of GABAergic and glutamatergic transmission. *Eur J Neurosci* **18**, 3199–3206.
- Luft AR, Macko RF, Forrester LW, Villagra F, Ivey F, Sorkin JD, Whitall J, McCombe-Waller S, Katzell L,



- Goldberg AP & Hanley DF (2008). Treadmill Exercise Activates Subcortical Neural Networks and Improves Walking After Stroke: A Randomized Controlled Trial. *Stroke* **39**, 3341–3350.
- Mackay-Lyons MJ & Makrides L (2004). Longitudinal changes in exercise capacity after stroke. *Arch Phys Med Rehabil* **85**, 1608–1612.
- Macko RF, DeSouza CA, Tretter LD, Silver KH, Smith GV, Anderson PA, Tomoyasu N, Gorman P & Dengel DR (1997). Treadmill Aerobic Exercise Training Reduces the Energy Expenditure and Cardiovascular Demands of Hemiparetic Gait in Chronic Stroke Patients: A Preliminary Report. *Stroke* **28**, 326–330.
- Macko RF, Ivey FM, Forrester LW, Hanley D, Sorokin JD, Katzel LI, Silver KH & Goldberg AP (2005). Treadmill Exercise Rehabilitation Improves Ambulatory Function and Cardiovascular Fitness in Patients With Chronic Stroke: A Randomized, Controlled Trial. *Stroke* **36**, 2206–2211.
- Madinier A, Bertrand N, Mossiat C, Prigent-Tessier A, Beley A, Marie C & Garnier P (2009). Microglial Involvement in Neuroplastic Changes Following Focal Brain Ischemia in Rats ed. Combs C. *PLoS ONE* **4**, e8101.
- Ma H, Yu B, Kong L, Zhang Y & Shi Y (2012). Neural Stem Cells Over-Expressing Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Stimulate Synaptic Protein Expression and Promote Functional Recovery Following Transplantation in Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Neurochem Res* **37**, 69–83.
- Mang CS, Campbell KL, Ross CJD & Boyd LA (2013). Promoting Neuroplasticity for Motor Rehabilitation After Stroke: Considering the Effects of Aerobic Exercise and Genetic Variation on Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Phys Ther* **93**, 1707–1716.
- Mann T, Lamberts RP & Lambert MI (2013). Methods of Prescribing Relative Exercise Intensity: Physiological and Practical Considerations. *Sports Med* **43**, 613–625.
- Marosi K & Mattson MP (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab* **25**, 89–98.
- Marsden DL, Dunn A, Callister R, Levi CR & Spratt NJ (2013). Characteristics of exercise training interventions to improve cardiorespiratory fitness after stroke: a systematic review with meta-analysis. *Neurorehabil Neural Repair* **27**, 775–788.
- Marzolini S, Oh P, McIlroy W & Brooks D (2012). The feasibility of cardiopulmonary exercise testing for prescribing exercise to people after stroke. *Stroke J Cereb Circ* **43**, 1075–1081.
- Matsuda F, Sakakima H & Yoshida Y (2011). The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol Oxf Engl* **201**, 275–287.
- Mattlage AE, Ashenden AL, Lentz AA, Rippee MA & Billinger SA (2013). Submaximal and peak cardiorespiratory response after moderate-high intensity exercise training in subacute stroke. *Cardiopulm Phys Ther J* **24**, 14–20.
- Ma Y, Wang J, Wang Y & Yang G-Y (2016). The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*; DOI: 10.1016/j.pneurobio.2016.01.005.
- Meeker R & Williams K (2015). The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen Res* **10**, 721.
- Meyer P, Gayda M, Juneau M & Nigam A (2013). High-intensity aerobic interval exercise in chronic heart failure. *Curr Heart Fail Rep* **10**, 130–138.
- Meyer T, Lucia A, Earnest CP & Kindermann W (2005). A conceptual framework for performance diagnosis and training prescription from submaximal gas exchange parameters--theory and application. *Int J Sports Med* **26 Suppl 1**, S38–S48.
- Midgley AW, McNaughton LR & Jones AM (2007). Training to enhance the physiological determinants of long-distance running performance: can valid recommendations be given to runners and coaches based on current scientific knowledge? *Sports Med Auckl NZ* **37**, 857–880.
- Miwa T, Furukawa S, Nakajima K, Furukawa Y & Kohsaka S (1997). Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J Neurosci Res* **50**, 1023–1029.
- Mizutani K, Sonoda S, Hayashi N, Takasaki A, Beppu H, Saitoh E & Shimpo K (2010). Analysis of protein expression profile in the cerebellum of cerebral infarction rats after treadmill training. *Am J Phys Med Rehabil* **89**, 107–114.
- Moholdt T, Madssen E, Rognmo Ø & Aamot IL (2014). The higher the better? Interval training intensity in coronary heart disease. *J Sci Med Sport* **17**, 506–510.

- Moholdt TT, Amundsen BH, Rustad LA, Wahba A, Løvø KT, Gullikstad LR, Bye A, Skogvoll E, Wisløff U & Slørdahl SA (2009). Aerobic interval training versus continuous moderate exercise after coronary artery bypass surgery: A randomized study of cardiovascular effects and quality of life. *Am Heart J* **158**, 1031–1037.
- Moreira JBN, Bechara LRG, Bozi LHM, Jannig PR, Monteiro AWA, Dourado PM, Wisløff U & Brum PC (2013). High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. *J Appl Physiol Bethesda Md* **114**, 1029–1041.
- Muller Y & Clos J (1997). p75LNTR: l'énigmatique récepteur des neurotrophines. *médecine/sciences* **13**, 978.
- Murphy TH & Corbett D (2009). Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour. *Nat Rev Neurosci* **10**, 861–872.
- Nokia MS, Lensu S, Ahtainen JP, Johansson PP, Koch LG, Britton SL & Kainulainen H (2016). Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained: Aerobic exercise promotes adult neurogenesis. *J Physiol* **594**, 1855–1873.
- Nudo RJ (2011). Neural bases of recovery after brain injury. *J Commun Disord* **44**, 515–520.
- Oh JD, Chartisathian K, Chase TN & Butcher LL (2000). Overexpression of neurotrophin receptor p75 contributes to the excitotoxin-induced cholinergic neuronal death in rat basal forebrain. *Brain Res* **853**, 174–185.
- Pang MYC, Charlesworth SA, Lau RWK & Chung RCK (2013). Using aerobic exercise to improve health outcomes and quality of life in stroke: evidence-based exercise prescription recommendations. *Cerebrovasc Dis Basel Switz* **35**, 7–22.
- Pang MYC, Eng JJ, Dawson AS & Gylfadóttir S (2006). The use of aerobic exercise training in improving aerobic capacity in individuals with stroke: a meta-analysis. *Clin Rehabil* **20**, 97–111.
- Pang PT, Teng HK, Zaitsev E, Woo NT, Sakata K, Zhen S, Teng KK, Yung W-H, Hempstead BL & Lu B (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. *Science* **306**, 487–491.
- Patel MD, Coshall C, Rudd AG & Wolfe CDA (2002). Cognitive impairment after stroke: clinical determinants and its associations with long-term stroke outcomes. *J Am Geriatr Soc* **50**, 700–706.
- Payne JA, Rivera C, Voipio J & Kaila K (2003). Cation–chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* **26**, 199–206.
- Pederson BA, Cope CR, Schroeder JM, Smith MW, Irimia JM, Thurberg BL, DePaoli-Roach AA & Roach PJ (2005). Exercise Capacity of Mice Genetically Lacking Muscle Glycogen Synthase: IN MICE, MUSCLE GLYCOGEN IS NOT ESSENTIAL FOR EXERCISE. *J Biol Chem* **280**, 17260–17265.
- Perry CGR, Heigenhauser GJF, Bonen A & Spriet LL (2008). High-intensity aerobic interval training increases fat and carbohydrate metabolic capacities in human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab Physiol Appl Nutr Metab* **33**, 1112–1123.
- Pin-Barre C & Laurin J (2015). Physical Exercise as a Diagnostic, Rehabilitation, and Preventive Tool: Influence on Neuroplasticity and Motor Recovery after Stroke. *Neural Plast* **2015**, 1–12.
- Pin-Barre C, Laurin J, Felix M-S, Pertici V, Kober F, Marqueste T, Matarazzo V, Muscatelli-Bossy F, Temprado J-J, Brisswalter J & Decherchi P (2014). Acute Neuromuscular Adaptation at the Spinal Level Following Middle Cerebral Artery Occlusion-Reperfusion in the Rat ed. Annunziato L. *PLoS ONE* **9**, e89953.
- Ploughman M, Austin MW, Glynn L & Corbett D (2015). The Effects of Poststroke Aerobic Exercise on Neuroplasticity: A Systematic Review of Animal and Clinical Studies. *Transl Stroke Res* **6**, 13–28.
- Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Dore JJ & Corbett D (2009). Brain-Derived Neurotrophic Factor Contributes to Recovery of Skilled Reaching After Focal Ischemia in Rats. *Stroke* **40**, 1490–1495.
- Pohl M, Mehrholz J, Ritschel C & Rückriem S (2002). Speed-dependent treadmill training in ambulatory hemiparetic stroke patients: a randomized controlled trial. *Stroke* **33**, 553–558.
- Potempa K, Lopez M, Braun LT, Szidon JP, Fogg L & Tincknell T (1995). Physiological outcomes of aerobic exercise training in hemiparetic stroke patients. *Stroke J Cereb Circ* **26**, 101–105.
- van Praag H, Fleshner M, Schwartz MW & Mattson MP (2014). Exercise, energy intake, glucose

- homeostasis, and the brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **34**, 15139–15149.
- Puyal J, Vaslin A, Mottier V & Clarke PGH (2009). Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. *Ann Neurol* **66**, 378–389.
- Quirié A, Hervieu M, Garnier P, Demougeot C, Mossiat C, Bertrand N, Martin A, Marie C & Prigent-Tessier A (2012). Comparative Effect of Treadmill Exercise on Mature BDNF Production in Control versus Stroke Rats ed. Arumugam TV. *PLoS ONE* **7**, e44218.
- Rakobowchuk M, McGowan CL, de Groot PC, Bruinsma D, Hartman JW, Phillips SM & MacDonald MJ (2005). Effect of whole body resistance training on arterial compliance in young men: Resistance training and arterial compliance. *Exp Physiol* **90**, 645–651.
- Rand D, Eng JJ, Tang P-F, Jeng J-S & Hung C (2009). How active are people with stroke?: use of accelerometers to assess physical activity. *Stroke J Cereb Circ* **40**, 163–168.
- Rimmer JH & Wang E (2005). Aerobic Exercise Training in Stroke Survivors. *Top Stroke Rehabil* **12**, 17–30.
- Risedal A, Zeng J & Johansson BB (1999). Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* **19**, 997–1003.
- Rivera C (2004). Mechanism of Activity-Dependent Downregulation of the Neuron-Specific K-Cl Cotransporter KCC2. *J Neurosci* **24**, 4683–4691.
- Rock KL, Latz E, Ontiveros F & Kono H (2010). The Sterile Inflammatory Response. *Annu Rev Immunol* **28**, 321–342.
- Rognmo Ø, Hetland E, Helgerud J, Hoff J & Slørdahl SA (2004). High intensity aerobic interval exercise is superior to moderate intensity exercise for increasing aerobic capacity in patients with coronary artery disease. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil Off J Eur Soc Cardiol Work Groups Epidemiol Prev Card Rehabil Exerc Physiol* **11**, 216–222.
- Rowe GC, Safdar A & Arany Z (2014). Running forward: new frontiers in endurance exercise biology. *Circulation* **129**, 798–810.
- Sartori CR, Vieira AS, Ferrari EM, Langone F, Tongiorgi E & Parada CA (2011). The antidepressive effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature BDNF, and proBDNF proteolytic cleavage-related genes, p11 and tPA. *Neuroscience* **180**, 9–18.
- Schäbitz WR, Schwab S, Spranger M & Hacke W (1997). Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* **17**, 500–506.
- Schäbitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M & Schwab S (2000). Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke J Cereb Circ* **31**, 2212–2217.
- Scharhag-Rosenberger F, Meyer T, Walitzek S & Kindermann W (2010). Effects of One Year Aerobic Endurance Training on Resting Metabolic Rate and Exercise Fat Oxidation in Previously Untrained Men and Women. *Int J Sports Med* **31**, 498–504.
- Schmidt A, Wellmann J, Schilling M, Strecker J-K, Sommer C, Schabitz W-R, Diederich K & Minnerup J (2014). Meta-analysis of the Efficacy of Different Training Strategies in Animal Models of Ischemic Stroke. *Stroke* **45**, 239–247.
- Schmidt W, Endres M, Dimeo F & Jungehülsing GJ (2013). Train the Vessel, Gain the Brain: Physical Activity and Vessel Function and the Impact on Stroke Prevention and Outcome in Cerebrovascular Disease. *Cerebrovasc Dis* **35**, 303–312.
- Shulga A, Magalhaes AC, Autio H, Plantman S, di Lieto A, Nykjaer A, Carlstedt T, Risling M, Arumae U, Castren E & Rivera C (2012). The Loop Diuretic Bumetanide Blocks Posttraumatic p75NTR Upregulation and Rescues Injured Neurons. *J Neurosci* **32**, 1757–1770.
- Shulga A, Thomas-Crusells J, Sigl T, Blaesse A, Mestres P, Meyer M, Yan Q, Kaila K, Saarma M, Rivera C & Giehl KM (2008). Posttraumatic GABA(A)-mediated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase is essential for the induction of brain-derived neurotrophic factor-dependent survival of mature central neurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* **28**, 6996–7005.
- Sofroniew MV, Howe CL & Mobley WC (2001). Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair. *Annu Rev Neurosci* **24**, 1217–1281.
- Stoller O, de Bruin ED, Knols RH & Hunt KJ (2012). Effects of cardiovascular exercise early after stroke: systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol*; DOI: 10.1186/1471-2377-12-45.

- Sun J, Ke Z, Yip SP, Hu X, Zheng X & Tong K (2014). Gradually Increased Training Intensity Benefits Rehabilitation Outcome after Stroke by BDNF Upregulation and Stress Suppression. *BioMed Res Int* **2014**, 1–8.
- Svensson M, Lexell J & Deierborg T (2015). Effects of Physical Exercise on Neuroinflammation, Neuroplasticity, Neurodegeneration, and Behavior: What We Can Learn From Animal Models in Clinical Settings. *Neurorehabil Neural Repair* **29**, 577–589.
- Takahashi H, Himi N, Kuniyasu K & Koga T (2012). Changes in the lactate threshold during treadmill exercise after microsphere-induced infarction in rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis Off J Natl Stroke Assoc* **21**, 647–651.
- Talwar T & Srivastava MVP (2014). Role of vascular endothelial growth factor and other growth factors in post-stroke recovery. *Ann Indian Acad Neurol* **17**, 1–6.
- Tang A, Eng JJ, Krassioukov AV, Madden KM, Mohammadi A, Tsang MYC & Tsang TSM (2014). Exercise-induced changes in cardiovascular function after stroke: a randomized controlled trial. *Int J Stroke* **9**, 883–889.
- Tang A, Marzolini S, Oh P, McIlroy W & Brooks D (2013). Factors associated with change in aerobic capacity following an exercise program for individuals with stroke. *J Rehabil Med* **45**, 32–37.
- Tang A, Sibley KM, Thomas SG, Bayley MT, Richardson D, McIlroy WE & Brooks D (2008). Effects of an Aerobic Exercise Program on Aerobic Capacity, Spatiotemporal Gait Parameters, and Functional Capacity in Subacute Stroke. *Neurorehabil Neural Repair* **23**, 398–406.
- Tang A, Sibley KM, Thomas SG, McIlroy WE & Brooks D (2006). Maximal exercise test results in subacute stroke. *Arch Phys Med Rehabil* **87**, 1100–1105.
- Thomas C, Bishop D, Moore-Morris T & Mercier J (2007). Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **293**, E916–E922.
- Tian X, Guo J, Zhu M, Li M, Wu G & Xia Y (2013).  $\delta$ -Opioid Receptor Activation Rescues the Functional TrkB Receptor and Protects the Brain from Ischemia-Reperfusion Injury in the Rat ed. Kleinschnitz C. *PLoS ONE* **8**, e69252.
- Tomczak CR, Jelani A, Haennel RG, Haykowsky MJ, Welsh R & Manns PJ (2008). Cardiac reserve and pulmonary gas exchange kinetics in patients with stroke. *Stroke J Cereb Circ* **39**, 3102–3106.
- Towbin H, Staehelin T & Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350–4354.
- Uluç K, Miranpuri A, Kujoth GC, Aktüre E & Başkaya MK (2011). Focal Cerebral Ischemia Model by Endovascular Suture Occlusion of the Middle Cerebral Artery in the Rat. *J Vis Exp*; DOI: 10.3791/1978.
- Vilela TC, Muller AP, Damiani AP, Macan TP, da Silva S, Canteiro PB, de Sena Casagrande A, Pedrosa GDS, Nesi RT, de Andrade VM & de Pinho RA (2016). Strength and Aerobic Exercises Improve Spatial Memory in Aging Rats Through Stimulating Distinct Neuroplasticity Mechanisms. *Mol Neurobiol*; DOI: 10.1007/s12035-016-0272-x.
- Wahl F, Allix M, Plotkine M & Boulu RG (1992). Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **23**, 267–272.
- Walz W & Mukerji S (1988). Lactate release from cultured astrocytes and neurons: a comparison. *Glia* **1**, 366–370.
- Wang H, Liu S, Wang H, Wang G & Zhu A (2015). The effect of propofol postconditioning on the expression of K(+)-Cl(-)-co-transporter 2 in GABAergic inhibitory interneurons of acute ischemia/reperfusion injury rats. *Brain Res* **1597**, 210–219.
- Wang J, Song H, Tang X, Yang Y, Vieira VJ, Niu Y & Ma Y (2012). Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scand J Med Sci Sports* **22**, 643–652.
- Wang R-Y, Yu S-M & Yang Y-R (2005). Treadmill training effects in different age groups following middle cerebral artery occlusion in rats. *Gerontology* **51**, 161–165.
- Warburton DER, McKenzie DC, Haykowsky MJ, Taylor A, Shoemaker P, Ignaszewski AP & Chan SY (2005). Effectiveness of high-intensity interval training for the rehabilitation of patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* **95**, 1080–1084.
- Ward NS (2005). Mechanisms underlying recovery of motor function after stroke. *Postgrad Med J* **81**, 510–514.

- Weston AR, Myburgh KH, Lindsay FH, Dennis SC, Noakes TD & Hawley JA (1997). Skeletal muscle buffering capacity and endurance performance after high-intensity interval training by well-trained cyclists. *Eur J Appl Physiol* **75**, 7–13.
- Weston KS, Wisløff U & Coombes JS (2014). High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* **48**, 1227–1234.
- Weston M, Weston KL, Prentis JM & Snowden CP (2016). High-intensity interval training (HIT) for effective and time-efficient pre-surgical exercise interventions. *Perioper Med Lond Engl* **5**, 2.
- Whipp BJ (1987). Dynamics of pulmonary gas exchange. *Circulation* **76**, VI18–VI28.
- Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum Ø, Haram PM, Tjønnå AE, Helgerud J, Slørdahl SA, Lee SJ, Videm V, Bye A, Smith GL, Najjar SM, Ellingsen Ø & Skjærpe T (2007). Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation* **115**, 3086–3094.
- Woo N-S, Lu J, England R, McClellan R, Dufour S, Mount DB, Deutch AY, Lovinger DM & Delpire E (2002). Hyperexcitability and epilepsy associated with disruption of the mouse neuronal-specific K-Cl cotransporter gene. *Hippocampus* **12**, 258–268.
- Wu D & Pardridge WM (1999). Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain. *Proc Natl Acad Sci* **96**, 254–259.
- Xiong X-Y, Liu L & Yang Q-W (2016). Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog Neurobiol* **142**, 23–44.
- Xu W, Mu X, Wang H, Song C, Ma W, Jolkonen J & Zhao C (2016). Chloride Co-transporter NKCC1 Inhibitor Bumetanide Enhances Neurogenesis and Behavioral Recovery in Rats After Experimental Stroke. *Mol Neurobiol*; DOI: 10.1007/s12035-016-9819-0.
- Zhang L, Hu X, Luo J, Li L, Chen X, Huang R & Pei Z (2013a). Physical exercise improves functional recovery through mitigation of autophagy, attenuation of apoptosis and enhancement of neurogenesis after MCAO in rats. *BMC Neurosci* **14**, 46.
- Zhang P, Zhang Y, Zhang J, Wu Y, Jia J, Wu J & Hu Y (2013b). Early Exercise Protects against Cerebral Ischemic Injury through Inhibiting Neuron Apoptosis in Cortex in Rats. *Int J Mol Sci* **14**, 6074–6089.
- Zhang Q-W, Deng X-X, Sun X, Xu J-X & Sun F-Y (2013c). Exercise Promotes Axon Regeneration of Newborn Striatonigral and Corticonigral Projection Neurons in Rats after Ischemic Stroke ed. Aumann TD. *PLoS ONE* **8**, e80139.
- Zhang Y, Zhang P, Shen X, Tian S, Wu Y, Zhu Y, Jia J, Wu J & Hu Y (2013d). Early Exercise Protects the Blood-Brain Barrier from Ischemic Brain Injury via the Regulation of MMP-9 and Occludin in Rats. *Int J Mol Sci* **14**, 11096–11112.
- Zhao LR, Mattsson B & Johansson BB (2000). Environmental influence on brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* **97**, 177–184.

### Conclusion générale et perspectives

Ces travaux de thèse s'articulaient autour de 2 axes de recherche dans lesquels l'exercice physique a joué un rôle prépondérant, et qui, nous le verrons, peuvent être complémentaires. Ce dernier a d'abord été employé comme un outil de diagnostic dans le premier axe, dont le propos était de déceler des dysfonctions sensorimotrices au niveau de la moelle épinière non-visibles dans les conditions de repos à partir d'un exercice fatigant. L'étude n°1 a montré que l'ischémie cérébrale induisait une fatigue précoce du muscle actif accompagnée d'une perturbation des mécanismes d'inhibition des réflexes somatiques spinaux, confirmant les hypothèses énoncées dans des travaux antérieurs chez le patient AVC (Hwang *et al.*, 2004; Schindler-Ivens *et al.*, 2008; Liang & Brown, 2015). L'utilisation de l'exercice isométrique fatigant nous a permis de postuler que les afférences musculaires métabosensibles, déjà connues pour moduler l'activité réflexe, pouvait contribuer à expliquer l'absence de modification de l'amplitude réflexe post-exercice.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons montré dans l'étude n°2 que l'action inhibitrice des afférences des groupes III et IV sur les réflexes somatiques était bien perturbée durant la phase aiguë post-ischémique sans affecter l'activité des récepteurs spécifiques de ces fibres afférentes. Les résultats de ce premier axe nous poussent à croire que la modification de l'action des afférences métabosensibles induite par l'ischémie cérébrale pourrait partiellement contribuer aux désordres sensorimoteurs observés et à la fatigue précoce des animaux lésés. Ainsi, cette plasticité spinale est un facteur non-négligeable à prendre en compte dans l'étude de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale. Ces résultats ouvrent la porte à plusieurs perspectives d'études.

Étant donné que l'analyse électrophysiologique ne semble pas suffisante pour déceler les modifications potentielles de la réponse des afférences à leur stimuli, ces résultats méritent d'être approfondis par une analyse immunohistologique des ganglions dorsaux marquant la

quantité de récepteurs moléculaires associés au groupe III et au groupe IV. Par ailleurs, des enregistrements effectués dans la période chronique seraient également pertinents dus aux atteintes musculaires liées au déconditionnement physique pouvant moduler l'activité des récepteurs. En effet, il est possible que la myotypologie et la quantité de fibres afférentes métabosensibles associées soient modifiées, comme cela a déjà été observé chez des rats ayant subi un infarctus du myocarde (Wang *et al.*, 2010). Cela engendrerait inévitablement des répercussions sur l'activité motrice mais aussi sur la fonction cardiorespiratoire dont les mécanismes post-ischémiques restent à découvrir.

Concernant l'axe 2, l'exercice physique a été utilisé comme un outil de rééducation. Il est apparu que l'intensité d'exercice était un paramètre majeur dans l'efficacité d'un programme d'endurance post-ischémique. En effet, après avoir basé nos intensités d'exercice sur le SL, nos résultats ont remis en question les recommandations actuelles en indiquant que les HIT représentent une stratégie prometteuse pour améliorer la récupération fonctionnelle (force de préhension de la patte parétique) et la récupération des performances d'endurance. Comme nous l'avons suggéré en discussion, les modifications observées au niveau de la  $V_{SL}$  et  $V_{max}$  pourraient être liées à un changement de l'activité métabolique au niveau musculaire. Il serait donc logique d'étudier les répercussions structurelles et fonctionnelles au niveau musculaire des HIT, en parallèle des analyses cérébrales après une ischémie cérébrale.

De manière intéressante, ces améliorations supérieures chez les animaux HIT étaient accompagnée d'une modification de l'activité microgliale et de l'expression du récepteur à neurotrophines le  $p75^{NTR}$ , pouvant contribuer à une plasticité synaptique bénéfique comme l'indiquait le changement du rapport NKCC1/KCC2. Notre étude a donc pu montrer que les exercices d'endurance intenses induisent des répercussions potentiellement encourageantes au niveau de l'inflammation, de la plasticité synaptique et de la récupération fonctionnelle.

Étant donné qu'il s'agit de la première étude à comparer différents exercices d'endurance suite à une ischémie cérébrale, les résultats associés à la partie neuroplasticité peuvent être considérés comme préliminaires et peuvent servir de tremplin à l'émergence d'autres études complémentaires. Ces études devraient se focaliser sur les effets des HIT post-ischémique vu que ce mode d'exercice impacterait davantage la neuroplasticité comme nous l'avons montré. Les pistes de recherche proposées ci-dessous ne sont pas exhaustives mais elles nous paraissent toutes aussi pertinentes les unes que les autres. Plus précisément, le rôle de l'intensité d'exercice sur les associations de récepteurs à neurotrophines et leurs répercussions moléculaires et fonctionnelles restent à déterminer. En effet, il pourrait être envisagé de compléter nos analyses par le marquage de plusieurs protéines connues pour interagir avec p75<sup>NTR</sup> afin de mieux connaître la nature de son action en réponse à l'entraînement, ce qui pourrait confirmer ou infirmer notre hypothèse (discussion du chapitre III). Il est alors possible de se poser les questions suivantes : Est ce que l'entraînement intense post-ischémique favorise l'interaction de p75<sup>NTR</sup> avec les récepteurs Trk ou avec les récepteurs non-neurotrophiques comme la sortiline ou le Nogo-A ? Quel peut être l'effet des HIT sur le passage du proBDNF vers le mBDNF post-ischémique ? Il serait également pertinent d'approfondir le rôle que pourrait jouer les HIT sur la plasticité synaptique par l'intermédiaire du BDNF et de sa libération par la microglie réactive ?

Par ailleurs, nos résultats ont mis en évidence qu'aucun effet n'a été relevé sur les fonctions sensorimotrices plus complexes (test de l'échelle par exemple). Ainsi, plusieurs stratégies d'amélioration de la récupération s'ouvrent à nous. Il est suggéré que l'entraînement d'endurance pourrait, outre ses effets sur la récupération déjà mentionnés, amplifier les répercussions des autres stratégies de rééducation fonctionnelle telles que les tâches motrices complexes ou les tâches cognitives. En effet, des études récentes montrent que les combinaisons de stratégies de rééducation incluant de l'endurance amplifient les effets



bénéfiques de la rééducation (Khan *et al.*, 2005; Ploughman *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2010; Constans *et al.*, 2016). Par exemple, coupler ce type d'entraînement d'endurance avec la réalisation de tâches spécifiques pourrait améliorer la récupération des fonctions sensorimotrices complexes et cognitives (Ploughman *et al.*, 2007). L'association avec des traitements pharmacologiques potentialisant ou complétant les effets des HIT pourrait être également envisagée.

Les 2 axes développés peuvent à présent se rejoindre dans des travaux futurs. Il nous avait semblé prématuré de mesurer l'effet d'un entraînement d'endurance sur l'évolution des mécanismes spinaux, et notamment sur l'activité des afférences métabosensibles puisque nos résultats de l'étude n°2 n'étaient pas assez finalisés pour pouvoir étudier les effets de l'entraînement au niveau des réflexes spinaux. Il semble maintenant pertinent de postuler que l'entraînement d'endurance de haute intensité pourrait influencer aussi bien les mécanismes spinaux que cérébraux *via* les retours sensoriels, incluant les afférences des groupes III et IV, ce qui représente un nouvel axe de recherche (Johansson, 2000; Ward, 2005).

Pour conclure, nous pouvons dire d'un point de vue clinique que les HIT pourraient induire des effets bénéfiques dans la fenêtre de plasticité la plus propice (phase aiguë/subaiguë) et fournir un gain de temps aux patients car les séances sont plus courtes et les effets plus rapides, et potentiellement plus importants. C'est une question à laquelle nous avons essayé de répondre dès le début de cette thèse de doctorat car nous avons voulu étudier les effets de l'intensité de l'entraînement chez le patient AVC en nous focalisant sur les paramètres métaboliques ( $VO_{2pic}$ , seuils ventilatoires, économie de course) et neuromusculaires (production de force et activité EMG). L'approche méthodologique de l'entraînement était similaire à celle réalisée chez l'animal car les intensités d'entraînement

sont déterminées à partir du SV1 (et non seuil lactique) et la charge de travail est harmonisée entre les groupes MOD et HIT. Les données, que nous pouvions avoir, auraient pu être complémentaires de celles obtenues chez l'animal. Cet essai clinique a reçu l'accord du CPP n°1 de Marseille dont le protocole est détaillé en annexe n°1. Malheureusement, diverses difficultés ne nous ont pas permis d'avoir de patients à ce jour bien que le matériel (K4b<sup>2</sup>, EMG, ergocycle) soit disposé au centre de rééducation de la Bourbonne à Aubagne et prêt à l'emploi. Il ne manquait que les patients. Néanmoins, cette étude est toujours d'actualité et les démarches pour attirer davantage de patients ont été entreprises. Finalement, avant de pouvoir déterminer la place exacte de l'entraînement intense dans la rééducation, d'autres études complémentaires chez le patient AVC et chez l'animal doivent être réalisées.

---

## Références

- Constans A, Pin-barre C, Temprado J-J, Decherchi P & Laurin J (2016). Influence of Aerobic Training and Combinations of Interventions on Cognition and Neuroplasticity after Stroke. *Front Aging Neurosci*; DOI: 10.3389/fnagi.2016.00164.
- Fang P -c., Barbay S, Plautz EJ, Hoover E, Strittmatter SM & Nudo RJ (2010). Combination of NEP 1-40 Treatment and Motor Training Enhances Behavioral Recovery After a Focal Cortical Infarct in Rats. *Stroke* **41**, 544–549.
- Hwang I-S, Lin C-F, Tung L-C & Wang C-H (2004). Responsiveness of the H reflex to loading and posture in patients following stroke. *J Electromyogr Kinesiol* **14**, 653–659.
- Johansson BB (2000). Brain plasticity and stroke rehabilitation. The Willis lecture. *Stroke* **31**, 223–230.
- Khan M, Sekhon B, Giri S, Jatana M, Gilg AG, Ayasolla K, Elango C, Singh AK & Singh I (2005). S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* **25**, 177–192.
- Liang JN & Brown DA (2015). Impaired H-Reflex Gain during Postural Loaded Locomotion in Individuals Post-Stroke ed. Lebedev MA. *PLOS ONE* **10**, e0144007.
- Ploughman M, Attwood Z, White N, Doré JJE & Corbett D (2007). Endurance exercise facilitates relearning of forelimb motor skill after focal ischemia: Endurance exercise facilitates forelimb recovery. *Eur J Neurosci* **25**, 3453–3460.
- Ploughman M, Windle V, MacLellan CL, White N, Dore JJ & Corbett D (2009). Brain-Derived Neurotrophic Factor Contributes to Recovery of Skilled Reaching After Focal Ischemia in Rats. *Stroke* **40**, 1490–1495.
- Schindler-Ivens S, Brown DA, Lewis GN, Nielsen JB, Ondishko KL & Wieser J (2008). Soleus H-reflex excitability during pedaling post-stroke. *Exp Brain Res* **188**, 465–474.
- Wang H-J, Li Y-L, Gao L, Zucker IH & Wang W (2010). Alteration in skeletal muscle afferents in rats with chronic heart failure: Group III and IV afferents in chronic heart failure. *J Physiol* **588**, 5033–5047.
- Ward NS (2005). Mechanisms underlying recovery of motor function after stroke. *Postgrad Med J* **81**, 510–514.
-

# Annexe 1

## **Comité de Protection des Personnes (CPP) de l'étude prévue chez le patient AVC**

- 1) Avis favorable du CPP de Marseille n°1
- 2) Protocole de la partie concernant les analyses physiologiques  
et fonctionnelles

# COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES SUD MÉDITERRANÉE I

Président  
Professeur Yves JAMMES

-----

## AVIS

Le Comité de Protection des Personnes Sud-Méditerranée I, agréé par arrêté ministériel en date du 12 juin 2012, constitué selon l'arrêté du Préfet de la Région Provence Alpes Côte d'Azur en date du 25 juin 2015,

en application du code de la santé publique et de la réglementation en vigueur relative aux recherches biomédicales ne portant pas sur un produit mentionné à l'article L.5311-1 du Code de la Santé Publique

ayant été saisi par un courrier du SMUC Marseille, promoteur, d'un dossier de recherche de recherche biomédicale intitulé :

**«L'INFLUENCE DE DIFFERENTS PROGRAMMES D'ENDURANCE SUR LES PARAMETRES NEUROMUSCULAIRES ET METABOLIQUES CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS D'UN AVC»**

Identifié sous le numéro ID RCB : 2014-A01242-45 et dirigé par le Dr Hervé COLLADO

ayant, après vérification de la conformité réglementaire, enregistré ce dossier le **24 août 2015** sous la référence interne **15 90**

Lors de sa séance plénière du **9 septembre 2015** au cours de laquelle  
Mesdames : C. ASSAÏANTE, D. CHANAUD, F. MOULARD, N. ROATTINO  
Messieurs : P. DE ALCALA, J-P BINON, J-C DUBUS, M. GAINNIER, J. GAUDART, P. ROLL, G. SPANO

Après avoir entendu le rapporteur du collège technique, le rapporteur du collège social et l'avis du méthodologiste ont délibéré,

Le Comité a demandé des modifications mineures à réception desquelles il délivrera un avis favorable. Le Comité ayant reçu le 14 septembre 2015, les modifications conformes à ses demandes et ayant examiné le dossier de recherche ainsi constitué :

- Courrier de demande d'autorisation daté et signé du 24 juillet 2015
- Réponses envoyées le 14 septembre 2015
- Formulaire de demande d'avis au Comité de protection des personnes daté du 6 août 2015
- Résumé
- Protocole version envoyée le 14 septembre 2015
- Notice d'information et formulaire de consentement version envoyée le 14 septembre 2015
- Attestation d'assurance datée du 19 août 2015

Hôpital Sainte Marguerite

270 Bd Sainte-Marguerite 13274 MARSEILLE

Tél. : 04.91.74.42.56 - Fax : 04.91.74.42.25 - E-mail : [cppsudmed1@gmail.com](mailto:cppsudmed1@gmail.com)

Site Internet : <http://www.cppsudmediterranee1.fr>

# COMITE DE PROTECTION DES PERSONNES SUD MÉDITERRANÉE I

Président  
Professeur Yves JAMMES

---

- CV de l'investigateur

a émis un

## AVIS FAVORABLE

à la mise en œuvre de cette recherche en soins courants considérant que les conditions de validité de la recherche, notamment celles définies dans l'article L. 1123-7 du code de la santé publique, étaient réunies.



Professeur Yves JAMMES

## PROJET DE RECHERCHE INTITULE

# **Influence de différents programmes d'endurance sur les paramètres neuromusculaires et métaboliques chez des patients atteints d'un AVC**

### **PROMOTEUR**

**Association** : Stade Marseillais Université Club (SMUC) Marseille

**Siège social** : 65 Avenue Clôt Bey, 13008 Marseille

### **INVESTIGATEUR PRINCIPAL**

Nom, prénom : Dr COLLADO Hervé / Dr RAMOS Jean-Vincent

Adresse professionnelle : Clinique de Provence-Bourbonne - route de Toulon BP 1040 – 260  
impasse Méditerranée - 13781 Aubagne

Téléphone : 0 826 30 53 35

Télécopie : 04 42 82 08 87

Email : *cmpr.accueil@gsante.fr*

# ***Protocole de l'étude***

## **2.1 Sujets participant à l'étude**

### **2.1.1 Critères d'inclusion**

Les critères d'inclusion sont :

- 1) Patients âgés de 45 à 75 ans (tranche d'âge classiquement représentée dans les études du domaine), hommes et femmes (même proportion dans chaque groupe), présentant une hémiparésie d'un premier AVC supra-tentorial ischémique ou une hémorragie intracérébrale.
- 2) Durée de l'hémiparésie supérieure à 4 semaines, peu ou pas de spasticité (échelle d'évaluation de la spasticité : Score d'Ashworth entre 0 et 1).
- 3) Condition cardiovasculaire stable avec un risque identique ou légèrement plus élevé lors d'un exercice soutenu : classe B selon l'American College of Sport Medicine (ACSM).
- 4) Caractéristiques cliniques des patient(e)s : absence d'insuffisance cardiaque ou insuffisance cardiaque classe I ou II de la New York Heart Association Classification system, absence d'ischémie ou d'angor de repos ou d'effort, pression artérielle appropriée durant l'exercice, absence de tachycardie ventriculaire.
- 5) Patient(e)s capables de se tenir sur un cyclo-ergomètre (ergocycle) et de pédaler volontairement jusqu'à l'atteinte d'une intensité correspondante seuils ventilatoires 1 et 2 (environ 60 et 80%  $VO_{2max}$ ). Ce qui est possible sur une majorité de patients AVC ([Mezzani et al., 2009](#)).
- 6) Patient(e)s ayant des troubles locomoteurs mais capables de marcher sans assistance.
- 7) Patient(e)s ayant accepté de participer à l'étude et ayant signé le consentement éclairé.
- 8) Patient(e)s capables de comprendre le français.

### **2.1.2 Critères d'exclusion**

Les critères d'exclusions sont :

- 1) Patient(e)s classé(e)s C ou D pour les risques d'exercice selon les critères de L'American College of Sports Medicine (ACSM) ([Balady et al., 1998](#)),

- 2) La présence de comorbidité : autres maladies neurologiques, pathologies cardiaques, troubles respiratoires.
- 3) Anomalies à l'épreuve d'effort (ischémie myocardique, arythmie)
- 4) Anomalie de la pression artérielle (>200 mmHg systolique ou >110 mmHg diastolique) et/ou de la fréquence cardiaque (>160 /min) durant l'étude.
- 5) Troubles orthostatiques (incapacité à se maintenir debout ou assis) ou troubles métaboliques non contrôlés.
- 6) Troubles orthopédiques qui affecteraient les performances comme un antécédent de fracture de jambe ou le port de prothèse totale de hanche, un rhumatisme inflammatoire en poussée.
- 7) Troubles cognitifs (Mini-Mental State Examination  $\geq$  23 sur 30), incapacité à communiquer, comprendre, à se soumettre aux exigences de l'étude ou à donner un consentement signé.
- 8) Patient(e)s susceptibles de ne pas participer à la totalité de l'étude, ne pouvant donner lui-même son consentement (détenus, majeurs sous tutelle), incapacité à comprendre la nature et les buts de l'étude, ou présentant des difficultés de compréhension pouvant compromettre le bon déroulement de l'étude.
- 9) Femme enceinte ou susceptible d'être enceinte au cours de l'année.
- 10) Patient(e)s refusant de signer le formulaire de consentement éclairé.

### **2.1.3 Groupes expérimentaux**

Le protocole est composé de 3 groupes expérimentaux comportant des sujets ayant subi un AVC (entre 1 et 3 mois post-AVC). Les patients sont randomisés puis répartis dans l'un des groupes suivant (même proportion d'hommes et de femmes, avec moyenne d'âge similaire, dans chacun des 3 groupes) :

- 1) Le groupe « fractionné (HIT) » où les patients suivront un programme de rééducation basé sur des exercices aérobies de type fractionné dont l'intensité est supérieure à SV1 (et  $\leq$  à SV2).
- 2) Le groupe « modéré (MOD) » où les patients suivront un programme de rééducation classique basé sur un exercice continu aérobie à intensité modérée (< à SV1).
- 3) Le groupe « Témoins (TEM) » composé de sujets AVC du même âge qui réaliseront les tests neuromusculaires et métaboliques 3 fois espacés de 4 semaines entre chaque session de tests.



Les patients des groupes HIT, MOD et TEM suivront l'ensemble des soins proposés par la clinique de Provence-Bourbonne (Médecin, kinésithérapie, orthophonie, etc...). Les patients du groupe TEM suivront exclusivement le programme de rééducation classique réalisé au centre de rééducation (et autres soins délivrés au centre de la Bourbonne), sans suivre un des 2 programmes d'endurance, proposés uniquement pour les groupes HIT et MOD. Cela permettra de s'assurer de la fiabilité et de la reproductibilité des mesures ainsi que de s'assurer que les programmes d'endurance en question ont un intérêt réel pour les patients.

#### **2.1.4 Détermination du nombre de sujets**

Étant donné qu'aucune étude n'a comparé ces 2 modes d'entraînement après un AVC sur les paramètres métaboliques et neuromusculaires, nous avons basé nos tests statistiques sur des études portant sur la comparaison entre l'exercice modéré et fractionné après infarctus du myocarde (Rognmo et al., 2004, Wisloff et al., 2007). De plus, nous nous sommes basés sur l'étude de Pohl et collaborateurs (Pohl et al., 2002), réalisée sur patients AVC ayant suivi un programme intense ou modéré pour déterminer le nombre de sujets nécessaires pour l'analyse fonctionnelle de la locomotion (TM6).

En prenant un risque alpha de 0,05 et avec une puissance de 80 %, compte tenu d'une différence attendue entre les groupes de patients sur l'économie de course (entre 7 et 9,1 ml/kg/min), et sur SV1 (entre 8 et 12 ml/kg/min) lors d'efforts sous-maximaux et les performances locomotrices lors du TM6, le nombre de sujets suffisant par groupe est de 20.

Afin d'étudier des patients ayant suivi le programme « fractionné », des patients ayant suivi le programme « continu » et des patients ayant suivi le programme de rééducation classique uniquement, **60 patients AVC** seront recrutés parmi les critères définis ci-dessus. Le calcul de la puissance statistique sera réalisée selon la méthode décrite par Howell DC (Méthodes statistiques en sciences humaines » De Boeck Université ; 1998).

## **2.2 Protocole**

Pour tout exercice physique (tests d'effort, mesure de force volontaire, séance de rééducation), les sujets sont informés qu'ils doivent immédiatement arrêter l'exercice en cours s'ils ressentent une douleur thoracique ou tout autre gêne physique. L'ensemble des épreuves d'endurance réalisées est fixé à des intensités sous-maximales afin de minimiser les risques potentiels d'ischémie et autres troubles cardiovasculaires.

Les mesures fonctionnelles, neuromusculaires et métaboliques sont effectuées sur 2 jours avec 1 jour de repos entre chaque évaluation. Ces évaluations sont réalisées 3 x au cours du protocole pour les 3 groupes :

- **PRE**, avant le commencement du programme de rééducation,
- **POST**, après le programme de rééducation (4 semaines plus tard),
- **POST-désentraînement**, 4 semaines après la fin de la période de rééducation, c'est-à-dire au moment où les effets du désentraînement sont significatifs pour la plupart des méthodes d'entraînement (Gondin et al., 2006, Wisloff et al., 2009).

### ***2.2.2 Analyses neuromusculaires et épreuve d'effort sous-maximale (jour 1)***

Les mesures neuromusculaires sont pratiquées sur le quadriceps du membre parétique et non-parétique.

#### ***a) Test de force maximale volontaire isocinétique (FMV) : contraction concentrique et excentrique***

La force isocinétique des muscles extenseurs du genou est effectuée lors de 3 essais de contractions concentrique et excentrique maximales sur un appareil isocinétique, séparées par 180 secondes de récupération. Des encouragements verbaux sont donnés à tous les sujets au cours de chaque enregistrement. La force est mesurée à partir d'une jauge de contrainte (TEDEA Huntleigh, Model no. 615, Tension / Compression load cell) reliée à un micro-ordinateur par l'intermédiaire d'une interface DELSYS® (DELSYS® systems, Inc, Italie). L'amplitude des 3 forces pour les contractions concentrique et excentrique est moyennée.

#### ***b) Mesures électromyographiques***

En parallèle, les mesures électromyographiques sont également effectuées sur le même muscle. L'EMG de surface des muscles *vastus medialis* (VM), *vastus lateralis* (VL) et *biceps femoris* (BF) est enregistrée à l'aide d'électrodes bipolaires (électrodes ECG universelles, Contrôle graphique médical, France) dont la distance inter-électrode est fixée à 25 mm (de centre à centre). En accord avec les recommandations internationales (SENIAM 1999), la résistance inter-électrode est maintenue inférieure à 5 k $\Omega$  par rasage, abrasion et lavage à l'alcool de la peau. Les électrodes sont positionnées, pour le VL, au 2/3 de la ligne prenant naissance au niveau de l'iliaque antérieur supérieur et allant jusqu'à la face latérale de la patella. Pour le VM, les électrodes sont positionnées à l'extrémité de la ligne entre l'iliaque

antérieur supérieur et l'articulation face à la frontière antérieure du ligament médian. Pour le BF, les électrodes sont positionnées à 50 % sur la ligne entre la tubérosité des ischios et l'épicondyle latéral du tibia. Chaque électrode est fermement fixée à l'aide de bandes adhésives. Les électrodes de référence (électrodes ECG universelles, Contrôle graphique médical, France) sont positionnées sur la patella gauche.

Pour assurer une comparaison intra-individuelle de l'enregistrement du signal EMG au cours des différents jours, la position des électrodes est soigneusement marquée sur la peau à l'aide d'encre indélébile. Les signaux EMG sont transmis à un micro-ordinateur via un convertisseur analogique-numérique (DELSYS® systems, Inc, Italie) pour des analyses différées. Ces signaux sont amplifiés (x500) et filtrés (bande passante de 10 à 500 Hz).

### ***C) Mesures du niveau d'activation volontaire***

L'application d'une stimulation supra-maximale au cours d'une contraction maximale volontaire permet d'estimer la proportion de la force maximale du muscle qui peut être produite volontairement (Taylor, 2009). Le principe de ce test est le suivant : toute augmentation de l'amplitude de la secousse surimposée ( $F_s$ ) reflète une diminution du niveau d'activation volontaire. En effet, cette stimulation devrait recruter toutes les unités motrices d'un muscle. En cas d'activation incomplète, la stimulation supra-maximale produit un gain de force. Autrement dit, si une unité motrice ne décharge pas de façon maximale pendant la contraction maximale volontaire, le potentiel d'action évoqué par la stimulation surimposée entraînera un gain de force additionnel dans les fibres musculaires de cette unité motrice. Donc, ce test estime le nombre d'unités motrices qui ne sont pas recrutées de manière maximale pendant la contraction. Dans la formule ci-dessous sont indiqués les différents éléments permettant de calculer l'activation volontaire, à partir du doublet évoqué au repos.

Dans cette étude, le niveau d'activation (NA) sera calculé à l'aide de la formule suivante, en accord avec Strojnik et Komi (Strojnik and Komi, 1998) :

$$\text{NA} = 100\% - \{[(F_s - T_b) \times (T_b / \text{FMV})] / \text{Twitch}\} \times 100\}$$

**FMV** = Force Maximale Volontaire

**F<sub>s</sub>** = Force surimposée

**T<sub>b</sub>** = Force obtenue avant la stimulation

**Twitch** = force induite par la stimulation sur le muscle relâché

Dans cette formule, la différence entre le niveau de force obtenu juste avant la stimulation ( $T_b$ ) et le niveau de force maximal atteint pendant la stimulation ( $F_s$ ) était comparé avec l'amplitude maximale de la secousse (twitch) évoquée au repos. Puisque la stimulation n'est pas toujours appliquée pendant le pic de force mais aussi lorsque le niveau de force commence à baisser, une correction de  $F_s-T_b$  est incluse dans la formule d'origine. En effet, parce que  $F_s-T_b$  a tendance à augmenter à un niveau de force plus bas que le maximal, le rapport  $T_b/FMIV$  est utilisé pour corriger  $F_s-T_b$ .

Rajoutons qu'à l'aide des électrodes EMG, la stimulation nous permettra d'obtenir une onde  $M_{max}$  (reflet de l'excitabilité membranaire et indicateur de la proportion d'axones moteurs dans le nerf en question) qui permettra de normaliser l'activité EMG pendant les tests de force.



DIGILINER LTD SAFETY TEST SPECIFICATION DS7A

File Ref: DS7AH/ppd

**DS7 - HIGH VOLTAGE STIMULATOR**  
(Internally known as CSA as now CE-marked)  
**SAFETY TEST CERTIFICATE**

This certificate indicates that this unit has passed the rigorous functional and safety specification as stated in the Digiliner documents indicated.

Instrument Serial Number: 0127A-2070	
IEC 6101-1:1989 - Equipment Class - "Type I" with "Type II" Applied Part	
Test Specification Issue Number: 12	Created: 25/5/2006
Safety Test Specification Issue Number: 6	Dated: 3/12/2008

**TESTS:** (Initial to indicate that unit has passed test)

a) mains tests: All mains tests are tested separately.

b) IEC specifications: SET

c) HV - Insulation: SET

d) Functionality: SET

Device Name: S FLETCHER  
Tester Signature: S Fletcher  
Date: 4/6/14

NOTE: The original of this form (and accompanying Rigol Safety Certificate) must be shipped with the unit.  
A copy must be kept in the Digiliner Safety Test Record file.

**Unit Manufactured and Distributed by:**

Digiliner Ltd  
37 Sydney  
Weymouth City  
Dorsetshire  
DT9 9BE  
England

Tel: +44 (0)1707 328847  
Fax: +44 (0)1707 321153  
Email: sales@digiliner.com

Issue 6 Page 4 of 4 Copyright © 1997

#### d) Épreuve d'effort sous-maximale

Ce test permet d'évaluer l'aptitude aérobie des patients. Un test d'effort progressif et sous-maximal sur cyclo-ergomètre est réalisé préalablement avant le début du programme pour tous les sujets. Dans un premier temps, les patients effectuent un échauffement de 5 minutes à 10 W. Le pédalage est fixé à 60 révolutions par minute (rev/min) sur cyclo-ergomètre (Monarch). Ensuite, l'intensité de l'exercice augmente progressivement de 10 W toutes les minutes (Calmels et al., 2011). Au cours de l'épreuve d'effort, les valeurs de  $VO_2$ ,  $VCO_2$ , de fréquence cardiaque, de débit ventilatoire (VE) sont relevées et les valeurs de  $SV1$

et SV2 sont calculées. Les intensités de travail personnalisées au patient seront fixées en fonction de la puissance obtenue à SV1 et SV2. Tous les tests sont réalisés sous monitoring cardiaque avec la présence d'un médecin.

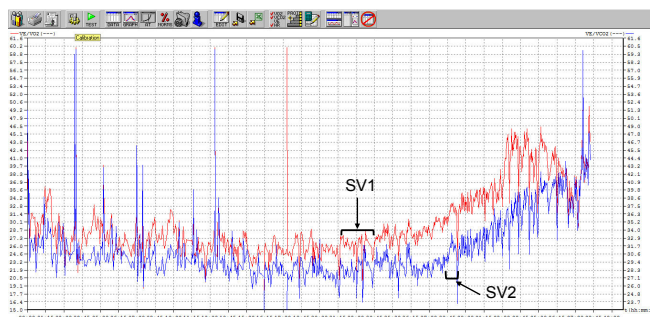
La puissance à SV1 est déterminée à partir de 2 méthodes (*graphique 2*) (Marzolini et al. 2012) que le  $K4b^2$  permet d'obtenir :

- **Équivalents ventilatoires** : lorsque  $V_E/VO_2$  augmente et  $V_E/VCO_2$  reste stable.
- **PET $O_2$  et PET $CO_2$**  « end tidal O2 pressure » et « end tidal CO2 pressure » : lorsque PET $O_2$  augmente sans diminution de PET $CO_2$ . Cette méthode permet une détection très sensible du SV1 sur les patients cardiovasculaires.

L'épreuve d'effort est arrêtée lorsque le sujet atteint une puissance correspondante à son SV2, ce qui est la limite haute des intensités que nous proposerons aux patients (groupe « Fractionné »). Le SV2 est déterminé par 2 moyens :

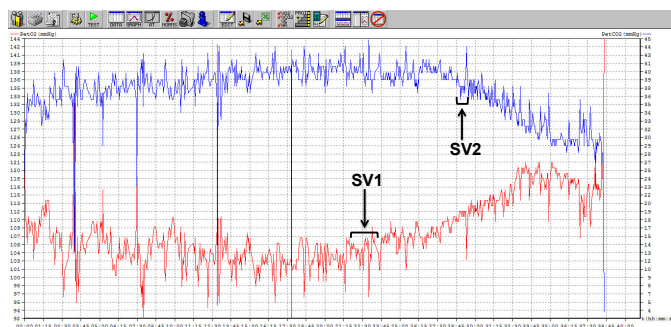
- **Équivalents ventilatoires** : lorsque  $V_E/VCO_2$  commence à augmenter.
- **PET $O_2$  et PET $CO_2$**  « end tidal O2 pressure » et « end tidal CO2 pressure » : lorsque PET $CO_2$  commence à diminuer.

L'utilisation de ces 2 méthodes permettra de déceler plus précisément les SV.



*Graphique 2 : Représentation schématique de l'évolution du rapport  $VCO_2/VO_2$ , des équivalents respiratoires ( $V_E/VO_2$  et  $V_E/VCO_2$ ), de PET $O_2$  et PET $CO_2$  et de la ventilation minute ( $V_E$ ) au cours d'une épreuve d'effort à intensité croissante. On peut repérer les SV1 et SV2 à partir de chacune de ces méthodes. (Données personnelles).*

Évolution de la  $V_E/VO_2$   
Évolution de la  $V_E/VCO_2$



Évolution de PET $O_2$  et de PET $CO_2$

Pour s'assurer que les sujets n'atteignent pas  $VO_{2max}$  qui correspond à un effort maximal, plusieurs critères seront contrôlés. L'exercice sera arrêté avant que les sujets n'atteignent une RER (respiratory exchange ratio,  $VCO_2/VO_2$ )  $\geq 1,15$  (donc vers 1,05), une  $FC < 90\%$  de la  $FC_{max}$  prédite ( $220 - \text{âge}$ ) (donc vers 85% de la valeur prédite) (Beltrami et al. 2014).

Si le sujet n'est pas capable d'atteindre cette limite (apparition d'une ischémie myocardique précoce au cours de l'effort, FC et/ou pression artérielle trop hautes, ECG anormal), il ne pourra plus être intégré dans cette étude. L'enregistrement ECG est réalisé par le **Dr. Claude Marble** pour chaque épreuve d'effort triangulaire qui pourra arrêter l'épreuve à tout moment en cas d'anomalie sur le tracé.

### ***2.2.3 Analyse fonctionnelle (jour 2)***

#### *a) Timed Up and Go (TUG)*

Il s'agit d'un test de mobilité fonctionnelle utilisé dans l'évaluation des patients hémiparétique. Il est composé de tâches motrices variées de la vie quotidienne (se lever, marcher, faire demi-tour, s'asseoir). Les sujets s'assoient sur une chaise, les bras en appui sur les accoudoirs, placée à 3 mètres d'un repère au sol. Il est dit au sujet de s'asseoir le dos contre le dossier. Lorsque le mot « go » est prononcé, ils doivent se lever, marcher le plus rapidement possible les 3 mètres jusqu'au repère ; se retourner de  $180^\circ$ , revenir vers la chaise et s'asseoir. Le début et la fin du chronométrage se font lorsque le patient est assis, dos en appui sur le dossier de la chaise. Chaque sujet fait 3 passages. Le meilleur des 3 tests est retenu. La même chaise est utilisée à chaque fois.

#### *b) Test de marche de 10 mètres (10 MWT)*

Il s'agit d'un test évaluant la vitesse de marche. On demande aux sujets de marcher le plus rapidement possible sur 20 mètres d'un point A à un point B. Le temps de parcours est chronométré. Les mesures sont effectuées sur les 10 premiers mètres. Le test est effectué à 3 reprises. Le meilleur des 3 passages est retenu pour l'analyse (Jackson et al., 2008).

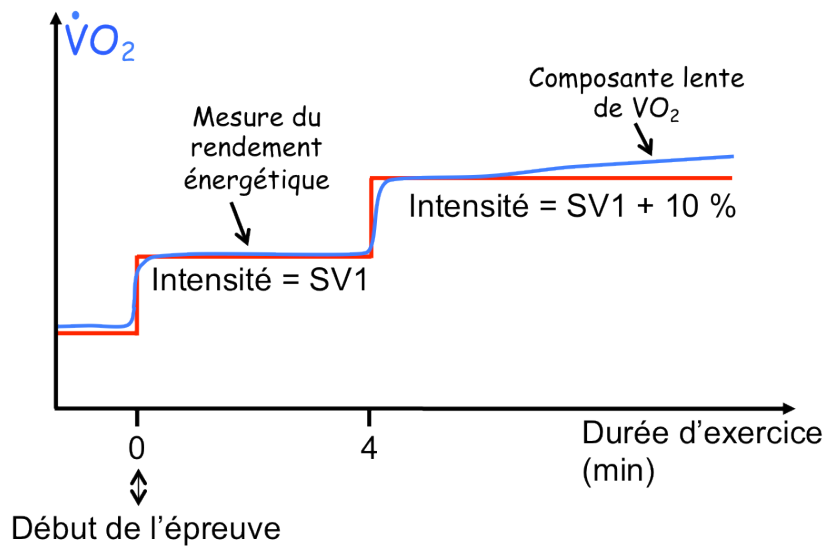
#### *c) Test de marche de 6 min (TM6)*

Ce test fonctionnel évalue la distance parcourue par les patients pendant une période de 6 min. De plus, l'analyse de la cadence des pas (fréquence de marche par minute, la longueur des pas) est analysée à l'aide d'un GaitRite (Rasekaba et al., 2009).

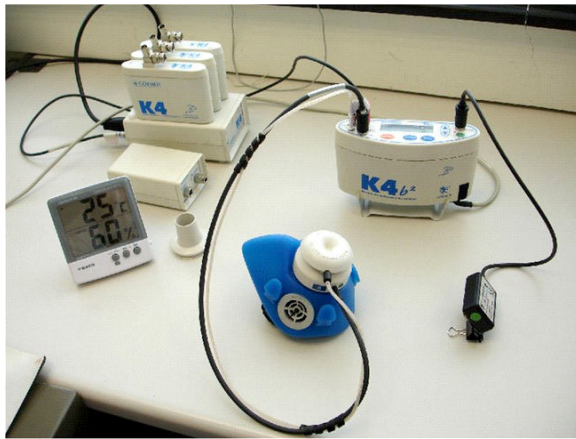
### ***2.2.4 Épreuve d'effort à charge constante : analyse du rendement énergétique et de la cinétique de $VO_2$ (jour 2)***

Le rendement musculaire de chaque patient est calculé à partir des valeurs de  $VO_2$  obtenues au cours d'un effort à intensité modérée constante sur ergocycle (en Watts) correspondante à SV1 -10 % pendant 7 min (Shinohara and Moritani, 1992). Cette période de temps est suffisante pour obtenir une consommation d' $O_2$  stable à cette intensité. Lors des mesures post-rééducation, le test est réalisé à la même intensité fixée avant la rééducation (même puissance de pédalage en Watts). Ainsi, il pourra être permis de savoir si les sujets consomment moins ou autant d' $O_2$  pour une intensité donnée après la période de rééducation. Ce test renseigne donc sur le rendement énergétique et donc sur l'économie de la locomotion (*graphique 3*).

Après les 7 min de pédalage à la vitesse correspondante au SV1 -10%, l'intensité augmente immédiatement jusqu'à atteindre la vitesse correspondante au SV1 +10 %. Lors d'un tel exercice au-dessus du SV1 (i.e exercice sous-maximal), l'analyse de l'évolution de  $VO_2$  permet d'observer la rapidité de l'ajustement du métabolisme aérobie et la composante lente de  $VO_2$ . Ces 2 critères sont des repères précis et reconnus afin d'évaluer la fatigabilité d'un sujet à l'effort d'endurance (Hill et al., 2003). Il est demandé aux patients de maintenir cette allure le plus longtemps possible. Une mesure EMG des quadriceps, ischios-jambiers est également réalisée au cours du test. Lors de la session post-entraînement et 4 semaines après l'entraînement, l'intensité absolue de l'exercice sera la même que celle de la première session. Ainsi, il est possible d'évaluer, 1) la capacité d'endurance du patient, 2) le rendement énergétique à une intensité donnée, 3) la tolérance à la fatigue induite par l'exercice et 4) le patron d'activation musculaire associé.



**Graphique 3 :** Représentation schématique de l'évolution de la consommation d'O<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub>) au cours d'une épreuve à intensité constante. On peut déterminer ici le rendement énergétique et l'évolution de la VO<sub>2</sub> au cours de l'effort dont la composante lente qui apparaît à des intensités supérieures au SV1.



**Figure 1 :** Appareil de mesure d'échange gazeux, le K4b<sup>2</sup>.

Cet appareil portable permet de mesurer la VO<sub>2</sub>, VCO<sub>2</sub>, V<sub>E</sub>, Quotient respiratoire, FC au cours d'un effort.

### 2.2.5 Versant psychologique

L'investissement physique régulier permet de faire évoluer positivement l'estime globale de soi et le niveau de compétences physiques perçues (Fox, 2000). Néanmoins, dans un tel contexte intensif et potentiellement anxiogène, il nous paraît pertinent de questionner :

- 1) l'impact d'un tel programme sur le niveau de stress perçu par le sujet.
- 2) l'impact d'un tel programme sur la dynamique de l'estime de soi physique et les différentes dimensions qui le composent :

Les évaluations psychométriques se feront au cours d'un entretien avec un psychologue clinicien, lequel prendra ainsi la forme d'un entretien directif. Le programme est prévu sur 4 semaines, au cours duquel nous procéderons à des mesures répétées : au début du programme (PRE), au milieu du programme soit au bout de 2 semaines (T1) et à la fin du programme (POST) ; soit 3 évaluations.



# Annexe 2

## Publications acceptées dans des revues indexées dans le JCR au cours de ce travail de thèse :

- 1) A new method to assess weight-bearing distribution after central nervous system lesions in rats. *Behavioral Brain Research*. 259, 78–84. doi:10.1016/j.bbr.2013.10.043. (2014).  
**\*PIN-BARRE, C.**, \*PERTICI, V., FELIX, M.-S., LAURIN, J., BRISSWALTER, J., DERCHERCHI, P. \*Vincent Pertici et Caroline Pin-Barre sont considérés comme 2 premiers auteurs de l'article. Ils ont contribué de manière similaire pour cette étude. [Impact factor (IF) 2014 : 3,417].
- 2) Acute Neuromuscular Adaptation at the Spinal Level Following Middle Cerebral Artery Occlusion-Reperfusion in the Rat. *PLoS ONE*. 9, e89953. doi:10.1371/journal.pone.0089953. (2014).  
**PIN-BARRE, C.**, LAURIN, J., FELIX, M.-S., PERTICI, V., MARQUESTE, T., KOBER, F., MATARAZZO, V., MUSCATELLI-BOSSY, F., TEMPREADO, J.-J., BRISSWALTER, J., DERCHERCHI, P. (IF 2014 : 3,73).
- 3) Physical Exercise as a Diagnostic, Rehabilitation, and Preventive Tool: Influence on Neuroplasticity and Motor Recovery after Stroke. *Neural Plasticity*. 2015, 1–12. doi:10.1155/2015/608581. (2015).  
**PIN-BARRE, C & LAURIN, J.** (IF 2015 : 3,582).
- 4) Influence of Aerobic Training and Combinations of Interventions on Cognition and Neuroplasticity after Stroke. *Front. Aging Neurosci*. 8. doi:10.3389/fnagi.2016.00164. (2016).  
**\*PIN-BARRE, C.**, \*CONSTANS A., LAURIN, J., TEMPREADO, J.-J., DERCHERCHI, P. (IF 2016 : 4,348). \*Annabelle Constans et Caroline Pin-Barre sont considérés comme 2 premiers auteurs de l'article. Elles ont contribué de manière similaire pour cette étude.
- 5) Functional and Neuromuscular Changes after Anterior Cruciate Ligament Rupture in Rats. *Medecine Science Sports Exercise*. 48, 1033–1043. doi:10.1249/MSS.0000000000000860. (2015).  
LAURIN, J., **PIN-BARRE, C.**, BERNARD, G., DOUSSET, E., DERCHERCHI, P. (IF 2015 : 3,983).

Provided for non-commercial research and education use.  
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at ScienceDirect

## Behavioural Brain Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bbr](http://www.elsevier.com/locate/bbr)

## Research report

## A new method to assess weight-bearing distribution after central nervous system lesions in rats

Vincent Pertici<sup>a,1</sup>, Caroline Pin-Barre<sup>b,1</sup>, Marie-Solenne Felix<sup>a</sup>, Jérôme Laurin<sup>a,\*</sup>, Jeanick Brisswalter<sup>b</sup>, Patrick Decherchi<sup>a</sup><sup>a</sup> Aix-Marseille Université (AMU) et Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7287 «Institut des Sciences du Mouvement (ISM): Etienne-Jules MAREY», Equipe «Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire» (PSNM), Parc Scientifique et Technologique de Luminy, Faculté des Sciences du Sport de Marseille, CC910 – 163 Avenue de Luminy, F-13288 Marseille cedex 09, France<sup>b</sup> Université de Nice Sophia-Antipolis et Université du Sud Toulon Var, EA 6309 «Motricité Humaine Éducation Sport Santé» (LAMHESS), UFR STAPS de Nice, 261, route de Grenoble, F-06205 Nice, France

## HIGHLIGHTS

- A new objective test to evaluate postural impairments after severe traumas.
- Postural activity is specifically altered after different central nervous injuries.
- Compensatory postural strategies were observed after each central nervous trauma.
- Physiological relevance in preclinical situations is considered.

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 30 September 2013

Received in revised form 23 October 2013

Accepted 26 October 2013

Available online 4 November 2013

## Keywords:

Stroke

Spinal cord injury

Postural strategy

Neuromuscular plasticity

## ABSTRACT

The aim of the present study is to assess the relevance of weight-bearing distribution (DWB) measurement in freely moving rats after stroke and thoracic spinal cord injuries. Animals were divided in 2 experiments: (1) The middle cerebral artery occlusion-reperfusion (MCAO-r) experiment containing the MCAO group in which focal brain ischaemia was induced by transient MCA occlusion and (2) the thoracic hemisection experiment containing the TH group in which a spinal cord hemisection was performed at the T<sub>10</sub> level. A Control and respective Sham groups were also included in each experiment. Not only the pressure exerted by each paw was measured but also different ratios such as: (1) the sum of the right and the left forepaws was normalized by the sum of the right and the left hindpaws (F/H), (2) the left forepaw was normalized by the right forepaw (LF/RF), (3) the left hindpaw was normalized by the right hindpaw (LH/RH). Additionally, the times spent on 3 paws and on 4 paws were measured. Only the time spent on 4 paws was shorter in the MCAO group than in the Control ( $p < 0.001$ ) and in the Sham ( $p < 0.01$ ) groups. The LH/RH ratio of the TH group at the 1st week was lower ( $p < 0.01$ ) than the pre-surgical value. Moreover, its F/H ratio was superior ( $p < 0.001$ ) to the ones of the Control and the Sham groups. Our study indicates that DWB should be more frequently used to evaluate both the severity of central nervous system traumas and the effectiveness of pharmacological and/or rehabilitation strategies.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Brain stroke and spinal cord injuries (SCI) are the leading reasons for long term-disability. More precisely, these pathologies are characterized by motor, sensory and autonomic dysfunctions [1,2]. Due to the fact that restoration of behavioural functions for patient is the main goal, efficient identification of behavioural changes is a

prerequisite for translational applications [3]. Behavioural assessment on rodents is essential to explore the extent of functional deficits and the beneficial effects of treatments after such traumas.

Currently, a wide range of behavioural tests has already been approved to quantify the motor and sensory residual functions after spinal cord injuries [4,5] or brain stroke [3,6]. Whatever the type of behavioural assessment (sensorimotor or locomotor tests), it was considered that a functional test should preferentially avoid familiarization procedure, fatigue accumulation, complex tasks, stress, food deprivation and motivation dependence [7].

The dynamic weight-bearing test (DWB), assessing the distribution of the pressure exerted by each paw, is exempt from the above-cited drawbacks. Indeed, contrary to the preceding

\* Corresponding author. Tel.: +33 04 91 82 84 11; fax: +33 04 91 82 84 09.

E-mail address: [jerome.laurin@univ-amu.fr](mailto:jerome.laurin@univ-amu.fr) (J. Laurin).URL: <http://www.ism.univmed.fr> (J. Laurin).<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

static weight-bearing test (SWB) carried out on restrained rats that only analyzed the hindpaws pressure, the DWB test is performed on free moving rats (hence the term “dynamic”). Thus, each paw pressure can be analyzed during static position periods, while avoiding stress accumulation. Moreover, the computer-assisted DWB test produces objective data allowing reproducibility which is also recommended for a behavioural test [8]. Consequently, the DWB test seems appropriate to reveal impairments induced by CNS injuries and to determine difference between the affected limbs. However, no information indicated that the DWB test could be used to detect behavioural alterations after CNS traumas.

The present study is designed to evaluate the relevance of weight-bearing distribution measurement in freely moving rats after CNS trauma (SCI and stroke). Because there are specific time periods for detecting impairments in each CNS trauma, we have chosen different recording time period depending on the lesion type. Stroke induces major physiological modifications during the 1st week post-ischaemia [9,10]. By contrast, a longer time period of at least 6 weeks was required for thoracic spinal cord hemisection (TH) [11].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Thirty-nine adult male Sprague Dawley rats, weighting 250–300 g (Centre d'Élevage Roger JANVIER®, Le Genest Saint Isle, France), were housed in smooth-bottomed plastic cages at 22 °C with a 12-h light/dark cycle. Food (Safe®, Augy, France) and water were available *ad libitum*. An acclimation period of 1 week was allowed before the initiation of the experiment. The weight of the rats was daily controlled.

The present study gathered 2 experiments: (1) The middle cerebral artery occlusion-reperfusion (MCAO-r) experiment containing the MCAO group ( $n=8$ ) in which focal brain ischaemia was induced by transient MCA occlusion and the SHAM group ( $n=6$ ) in which the surgery was performed without the occlusion and (2) the thoracic hemisection experiment containing the TH group ( $n=7$ ) in which a spinal cord hemisection was performed at the T<sub>10</sub> level and the SHAM group ( $n=6$ ) in which the surgery was carried out without the spinal cord hemisection. Additionally, a Control group ( $n=12$ ) was also included in the study.

### 2.2. Ethical approval

Anaesthesia and surgical procedures were performed according to the French law on animal care guidelines and the Animal Care Committees of Aix-Marseille Université (AMU) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) approved our protocols. Individual conducting researches were listed in the authorized personnel section of the animal research protocol or added to a previously approved protocol. Furthermore, experiments were performed following the recommendations provided in the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health) and in accordance with the European Community's council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

No clinical sign of pain or unpleasant sensation (i.e. screech, prostration, hyperactivity, anorexia) and no paw-eating behaviour were observed through the study.

At the end of the experiments, animals were sacrificed by an intraperitoneal overdose (3 ml) of sodium pentobarbital solution (Nembutal®, Sanofi Santé Animale, Libourne, France – 0.6 g kg<sup>-1</sup>).

### 2.3. Surgical protocols

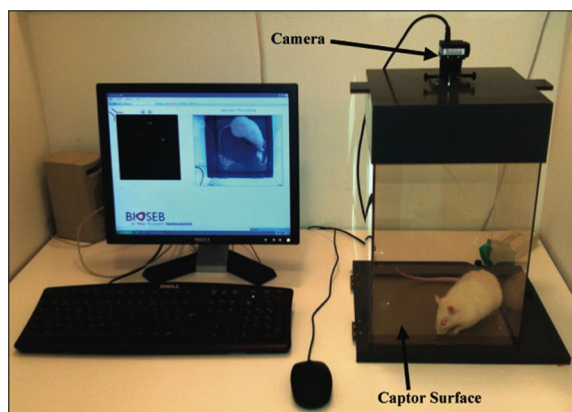
#### 2.3.1. Middle cerebral artery occlusion-reperfusion

In order to optimize reproducibility of the cerebral lesion severity, it is noteworthy to precise that the MCAO-r was performed on rat weighting exclusively between 250 g and 270 g. Animals weighting more than 270 g were excluded from the study. Central temperature was maintained at about 37–38 °C with a homeothermic blanket (Harvard Homeothermic Blanket Control Unit, K01345CE) driven by a rectal thermal probe.

Anaesthesia was induced with 5% isoflurane and maintained with 2.5–2% isoflurane through a facemask, supplemented with oxygen. A 0.2 ml injection of 0.5% bupivacaine was subcutaneously performed along the prospective incision site. Throughout the surgery, animals were positioned in dorsal *decubitus*. A 4 cm ventral midline incision was performed and the superficial fascia was dissected. The right external, internal, and common carotid arteries (ECA, ICA, CCA) were exposed without damaging the vagus nerve and its collaterals. The occipital artery (OA) and the superior thyroid artery (ST) were cauterized (Bovi Medical Corporation Clearwater, FL 33760, USA). After placing microsurgical clips on CCA and ICA, a partial arteriotomy was performed on ECA with micro-scissors. A 4-0 monofilament nylon suture (total length: 3 cm; silicon-coated tip length and diameter: 5 mm and 0.39 ± 0.02 mm, respectively; Doccol Corp., MCAO suture PK10, 40-333PK10, Redland, CA, USA) was inserted into the ECA lumen down towards the CCA where the microsurgical clip was located. The tip of the monofilament was then introduced into the ICA via the ECA and approximately pushed 20 mm away from the carotid bifurcation. Blood flow was thus blocked at the MCA origin. After 120 min of occlusion, the monofilament was carefully removed and the ICA was permanently closed by electrocoagulation to prevent bleeding [12,13]. Finally, the skin was sutured and animals returned in individual cages.

#### 2.3.2. Thoracic spinal hemisection

Rats were anaesthetized with choral hydrate intraperitoneal injection (0.5 g kg<sup>-1</sup>, Sigma, St. Louis, MO, USA). The animal's back was shaved and aseptically prepared with a povidone-iodine scrub swab stick (Professional Disposables, Orangeburg, NY). Central temperature was maintained constant at 37–38 °C with a homeothermic blanket (Harvard Apparatus®, Holliston, USA) driven by a rectal thermal probe. With the aid of a dissecting microscope, a midline incision was made over the C<sub>6</sub>–T<sub>13</sub> spinous processes. Dorsal muscles were cut and maintained on the side using retractors. While firmly maintaining the spinal column by spinous processes, a laminectomy at the T<sub>9</sub>–T<sub>10</sub> vertebral levels was performed using a Friedman-Pearson Rongeur (0.7 mm Cup Curved, FST, Heidelberg, Germany). Following dural incision, the exposed dorsal surface of the spinal cord was rinsed with cold saline to favour vasoconstriction. Finally, a left spinal cord hemi-transection was realized by the use of a sharp blade. Close examination of the cut edges of the cord confirmed that the surface of the tissue was free of meninges or blood clots. The lesion site was covered with a film of bioabsorbable artificial dural substitute (Seamdura®, Gunze Ltd., Codman, Johnson and Johnson Company) to isolate spinal cord from the overlying muscles. Muscles and skin were separately sutured (Vicryl® 3-0, Ethicon France). Rats were rehydrated with a bolus of saline (3 ml, subcutaneous) to replace fluid lost during the surgical procedure and received a subcutaneous injection of an analgesic (semi-synthetic opioid, buprenorphine, 0.05 mg kg<sup>-1</sup>). Then, they were kept in individual cages under heat lamps for 12–24 h. Housed in a non-enriched environment, the rats were daily observed during the next 8 weeks. Manual bladder expression was performed at least twice daily until bladder reflex was re-established.



**Fig. 1.** Dynamic weight bearing system. The device consists of a Plexiglas® enclosure with a calibrated weight transducer pad in which the rat is allowed to move freely. Using a synchronized video-recording and a scaled map of the stimulated captors, the pressure exerted by each paw is measured.

#### 2.4. Dynamic weight-bearing distribution assessment

The weight-bearing distribution was assessed by a biometric floor instrumented cage (Dynamic Weight-Bearing, Bioseb® Development, Vitrolles, France) (Fig. 1). The device consisted of a Plexiglas® enclosure (W22 × L22 × H30 cm<sup>3</sup>) with a calibrated weight transducer pad composed of 44 × 44 captors (Captor surface: 10.89 mm<sup>2</sup>; Captor threshold: 0.1 g; Matrix Sensor 5250 type: /10, TEKSCAN Inc., Boston, MA, USA). The rat was allowed to move freely within the apparatus for 2 trials of 5 min each. Using a synchronized video-recording and a scaled map of the stimulated captors, each paw of the rat was validated by an observer and identified as a unique paw. Only stable paw pressures of at least 0.2 s were kept for further analysis.

##### 2.4.1. The pressure exerted by paw

The pressure exerted by each paw (in grams) was only measured when the four paws were in contact with the biometric floor and then normalized by the total weight of the rat. Ratios distinguishing the forepaws vs. hindpaws and the right vs. left side were calculated to assess the weight-bearing distribution: (1) the sum of the right and the left forepaws (F) was normalized by the sum of the right and the left hindpaws (H) (F/H ratio), (2) the left forepaw (LF) was normalized by the right forepaw (RF) (LF/RF ratio), (3) the left hindpaw (LH) was normalized by the right hindpaw (RH) (LH/RH ratio).

##### 2.4.2. Time spent on 3 paws and on 4 paws

The time spent on 3 paws and on 4 paws (in seconds) was measured to determine the solicitation of the affected paw in postural stability. In other words, if the affected paw was not used in static position, the time spent on 3 paws should be longer. The time spent on 2 paws referring to the explorative period was discarded for analysis. Given that the software just kept static position of the rat, the recording period could vary between animals. Consequently, the time periods spent on 3 paws and on 4 paws were normalized by the total time spent in static position for each recording.

#### 2.5. Neurological examination after MCAO-r

A neurological examination was performed after MCAO-r to ensure that the ischaemia induced reliable sensorimotor impairments. A neurologic grading system with a five-point scale (0–4) was used: 0=no apparent deficits; 1=left forepaw flexion; 2=decreased grip of the left forepaw while tail pulled;

**Table 1**

Neurological score after MCAO-r. Neurological score was comprised between 0 and 4 depending of the severity of the lesion.

	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7
Control	0	0	0	0	0	0	0
SHAM	0	0	0	0	0	0	0
MCAO	4*	4*	3*	3*	3*	3*	3*

\* Significant differences between MCAO and the 2 other groups ( $p < 0.001$ ).

3 = spontaneous movement in all directions; left circling only if pulled by the tail; 4 = spontaneous left circling [14].

#### 2.6. Basso, Beattie, and Bresnahan Scale Locomotor Assessment (BBB score) after T<sub>10</sub> hemisection

The BBB score was used to ensure that the thoracic spinal cord injury induced significant locomotor deficits [15]. The BBB score assesses hindlimbs functions on a scale from 0 (complete hindlimb paralysis) to 21 (normal locomotion). Each point represents a specific set of characteristics displayed by the animals during free-moving locomotion. The test was performed in an open field once a week for 8 weeks. This test takes into account the motion degree of particular joints of the hindlimbs, the trunk stability during movement and the placement of each paw of the hindlimbs.

#### 2.7. Statistical analysis

Data processing was performed using a software program (SigmaStat® 2.03, Statistical Software, San Jose, CA, USA). Data were expressed as mean ± SEM.

The pressures exerted by each paw in percent of the total weight of the rat were averaged and compared in pre-surgical and post-surgical sessions. In order to determine differences between groups over time, a two-way repeated measures ANOVA (group × time) was calculated. *Post hoc* multiple group comparisons were performed with a Student–Newman–Keuls method.

Results were considered significant if the  $p$ -value fell below 0.05.

### 3. Results

#### 3.1. Cerebral ischaemia

The rat weight decreased between 11% and 20% after MCAO-r throughout protocol duration while the weight of SHAM rats was similar to the one of Control rats.

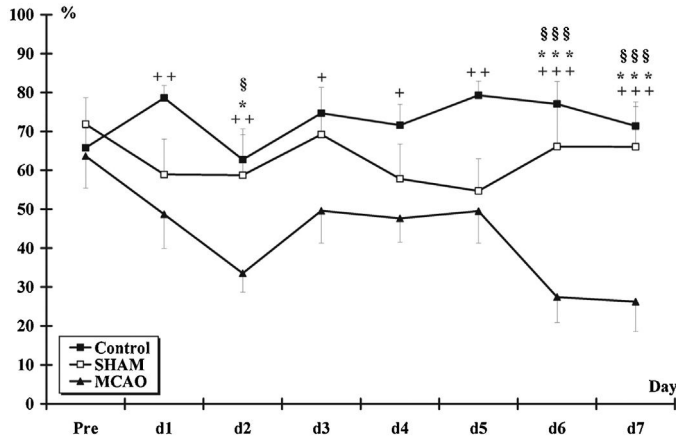
##### 3.1.1. Neurological examination after MCAO-r

No significant difference was observed between Control and SHAM groups. The neurological score of the MCAO group was significantly increase compared to both Control and SHAM groups from the 1st to the 7th day ( $p < 0.001$ ; score = 4 at day 1 and day 2. Then, the score = 3 from day 3 to day 7) (Table 1).

##### 3.1.2. The dynamic weight-bearing test after MCAO-r

**3.1.2.1. Pressure exerted by each paw and pressure ratios.** No significant difference was observed in the pressure (in grams) exerted by each paw and in the pressure ratios within and between groups (data not shown).

**3.1.2.2. Time spent on 4 paws.** Given that results of time spent on 3 paws followed the exact opposite behavioural pattern compared to results of time spent on 4 paws, only data of the latter were presented.



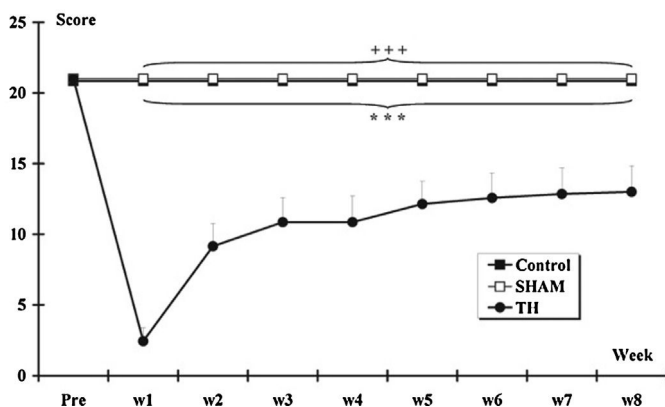
**Fig. 2.** Time spent on 4 paws after MCAO-r. The time spent on all fours is expressed as a percentage of the total time spent on 3 and 4 paws. Significant differences in the time spent on 4 paws are indicated by \* (MCAO pre- vs. MCAO post-), + (Control vs. MCAO) and § (SHAM vs. MCAO). (One symbol  $p < 0.05$ ; 2 symbols  $p < 0.01$  and 3 symbols  $p < 0.001$ .)

No difference was observed in the Control and the SHAM groups. Likewise, no difference was also found between these 2 groups. The pre-surgical time spent on 4 paws was similar between all groups. The time spent on 4 paws (normalized by total time) was significantly shorter in the MCAO group than in the Control ( $p < 0.001$ ) and in the SHAM ( $p < 0.01$ ) groups. Moreover, the times spent on 4 paws in the MCAO group at the 2nd ( $p < 0.05$ ), 6th and 7th (both  $p < 0.001$ ) days were significantly shorter than the pre-surgical values. The times spent on all fours from the 1st to the 7th day in the MCAO group were significantly lower ( $p < 0.01$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ ;  $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively) than the ones of the Control group. The times spent on 4 paws at the 2nd, 6th and 7th days post-surgery in the MCAO group were significantly ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.001$  and  $p < 0.001$ ) lower than the ones of the SHAM group. The time spent on 4 paws at the 5th day in the SHAM group was higher than in the Control group ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2).

### 3.2. Spinal cord injury

#### 3.2.1. The BBB score after $T_{10}$ hemisection

One week after the lesion, the BBB score in the TH group ( $2.43 \pm 0.95$ ) was significantly lower ( $p < 0.001$ ) than the one of the Control and SHAM groups ( $21.00 \pm 0.00$  for both). The BBB score in the TH group stayed significantly lower ( $p < 0.001$ ) than the 2 other groups through the protocol (Fig. 3).



**Fig. 3.** BBB locomotor rating scale. The score is plot over time after spinal cord hemisection. Significant differences in the BBB scores are indicated by \*\*\* (TH pre- vs. TH post-) and +++ (Control and SHAM vs. TH) ( $p < 0.001$ ).

#### 3.2.2. The dynamic weight-bearing test after $T_{10}$ hemisection

**3.2.2.1. Pressure exerted by each paw.** No difference was observed in the Control and the SHAM groups. Likewise, no difference was also found between these 2 groups. Moreover, pre-surgical data of all the characteristics were similar between the 3 groups.

The pressures exerted by the LF of the TH group were significantly higher than the ones of the Control ( $p < 0.01$ ) and the SHAM ( $p < 0.05$ ) groups. The pressures exerted by the RF of the TH group were significantly higher than the ones of the Control ( $p < 0.001$ ) and the SHAM ( $p < 0.01$ ) groups. The pressures exerted by the LH of the TH group were significantly lower ( $p < 0.001$ ) than in the Control and the SHAM groups. The pressures exerted by the LH of the TH group at the 1st ( $15.89 \pm 3.12\%$ ), 2nd ( $23.49 \pm 2.13\%$ ), 3rd ( $25.21 \pm 2.39\%$ ) and 4th ( $24.85 \pm 1.41\%$ ) weeks post-surgery were lower ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$ , respectively) than the pre-surgical value ( $34.37 \pm 0.97\%$ ). The LH values of the TH group at the 1st, the 2nd, the 3rd and the 4th weeks post-surgery were significantly lower than the ones of both the Control ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) and the SHAM ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.01$ ;  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively) groups.

Difference in the pressure exerted by the RH was neither observed within the TH group nor between the TH group and the other groups (Fig. 4).

**3.2.2.2. Pressure ratios.** No difference was observed in the Control and the SHAM groups. Likewise, no difference was also found between these 2 groups. Pre-surgical ratios were similar between the 3 studied groups.

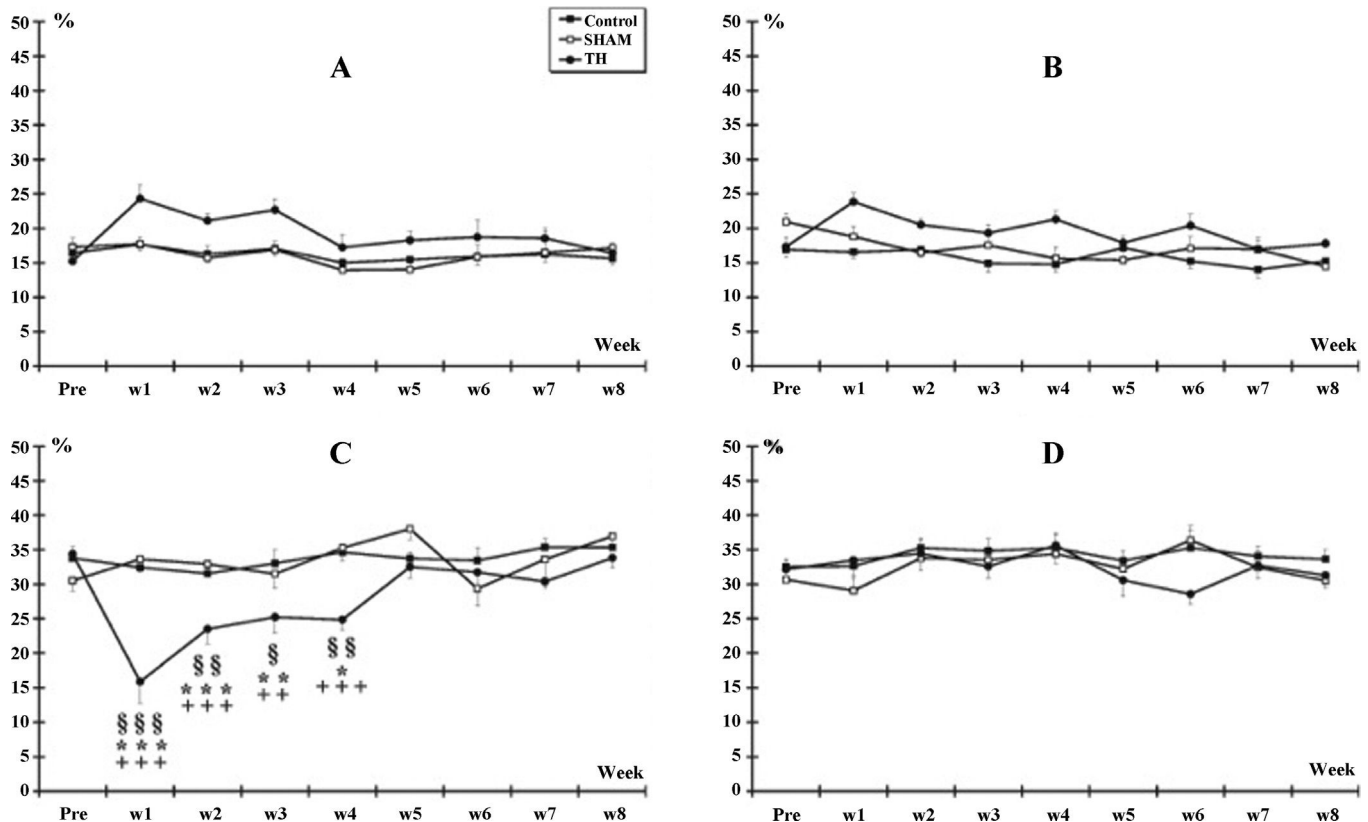
The F/H ratios of the TH group were significantly superior ( $p < 0.001$ ) to the ones of the Control and the SHAM groups. The F/H ratios of the TH group at the 1st ( $1.00 \pm 0.11$ ), 2nd ( $0.73 \pm 0.03$ ) and 3rd ( $0.75 \pm 0.07$ ) weeks post-surgery were significantly higher ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$  and  $p < 0.05$ , respectively) than the pre-surgical value ( $0.50 \pm 0.05$ ). The F/H ratios of the TH group at the 1st, the 2nd, the 3rd, the 4th ( $0.64 \pm 0.04$ ) and the 6th ( $0.68 \pm 0.08$ ) weeks post-surgery were greater ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$  and  $p < 0.05$ , respectively) than the ones of the Control group. The F/H ratios of the TH group at the 1st, 2nd, 3rd and 4th weeks were superior ( $p < 0.001$ ;  $p < 0.05$ ;  $p < 0.05$  and  $p < 0.05$ , respectively) to the ones of the SHAM group.

The LH/RH ratio of the TH group at the 1st week post-surgery ( $0.50 \pm 0.13$ ) was significantly lower ( $p < 0.01$ ) than its pre-surgical value ( $1.10 \pm 0.06$ ). The LH/RH ratios of the TH group at both the 1st and the 2nd weeks post-surgery ( $0.74 \pm 0.12$ ) were lower than the ones of the SHAM group ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively) while only the 1st week post-surgery was lower than the one of the Control group ( $p < 0.001$ ). However, no difference was observed in the TH group for the LF/RF ratios. No difference for the LF/RF ratios in the TH group was also found compared to the other groups (Fig. 5).

**3.2.2.3. Time spent on 4 paws.** No difference in the time spent on 4 paws was observed within the Control, the SHAM and the TH groups. However, while no difference was found between the Control and the SHAM groups, the time spent on all fours in the TH group was significantly longer ( $p < 0.05$ ) than in the Control group (Fig. 6).

## 4. Discussion

To the best of our knowledge, no previous study used the weight-bearing distribution in static position following CNS traumas as a tool to assess functional sensorimotor deficits and spontaneous recovery. The relevance of weight-bearing distribution is evaluated in the present study following stroke and spinal



**Fig. 4.** Pressure exerted by each paw after thoracic hemisection. The pressure exerted by each paw is expressed as a percentage of the total weight. (A) Pressure of the left forepaw. (B) Pressure of the right forepaw. (C) Pressure of the left hindpaw. (D) Pressure of the right hindpaw. Significant differences in the pressure exerted by each paw are indicated by \* (TH pre- vs. TH post-), + (Control vs. TH) and § (SHAM vs. TH). (One symbol  $p < 0.05$ ; 2 symbols  $p < 0.01$  and 3 symbols  $p < 0.001$ .)

cord injury. The times spent on 3 paws and on 4 paws were also taken into account in order to analyze the preferred stance pattern.

#### 4.1. An advanced in the weight-bearing distribution measurement

The SWB system solely assesses hindpaws pressure of a restricted rat in an upright position, which differs from their natural posture [16]. Moreover, due to the fact that the forepaws are placed on a Plexiglas® support, their influence on the pressure exerted by the hindpaws could not be appreciated. Yet, we just found that the role of forelimbs in postural adaptation following spinal cord injury could not be neglected. In accordance to a previous study [17], the DWB seems more suitable than SWB to distinguish behavioural impairments after CNS traumas.

#### 4.2. Altered weight-bearing distribution following MCAO-r and TH hemisection

Our results indicated that MCAO-r and spinal cord injury induced different and specific postural adaptation. Severe sensorimotor impairments after MCAO-r and spinal cord injuries were, respectively, confirmed by the neurological score and the BBB score throughout the protocol. Indeed, the neurological score clearly indicated that rats were spontaneously left circling after MCAO-r. Furthermore, the low BBB score revealed strong locomotor deficits for the left hindlimb.

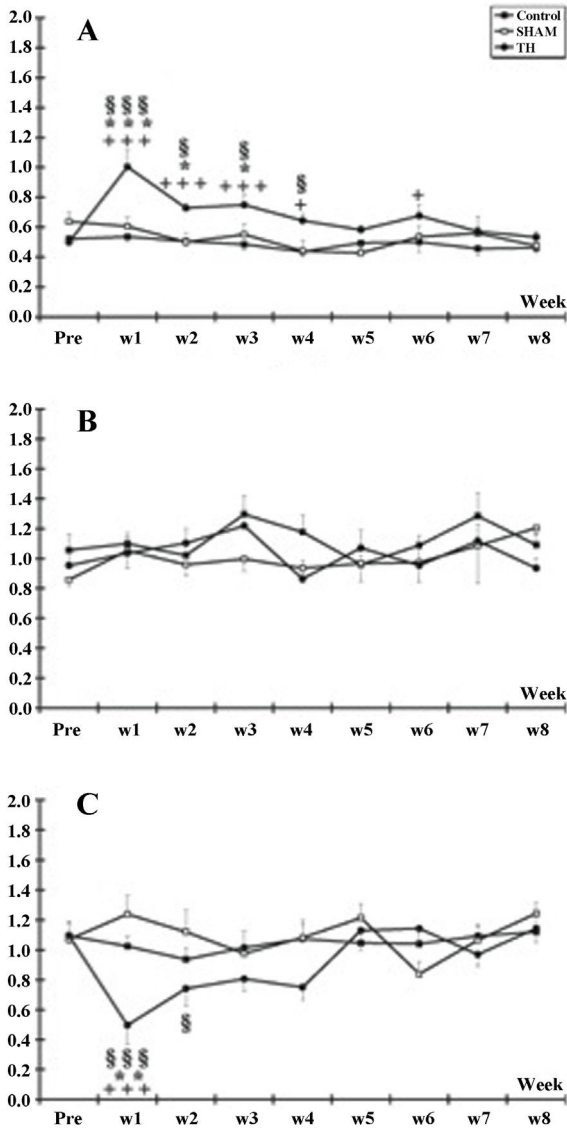
##### 4.2.1. MCAO-r

The rat weight decreased after MCAO-r as previously described [18]. Some authors showed that transection of the ECA may be associated with tissue damage of the muscles of mastication affecting

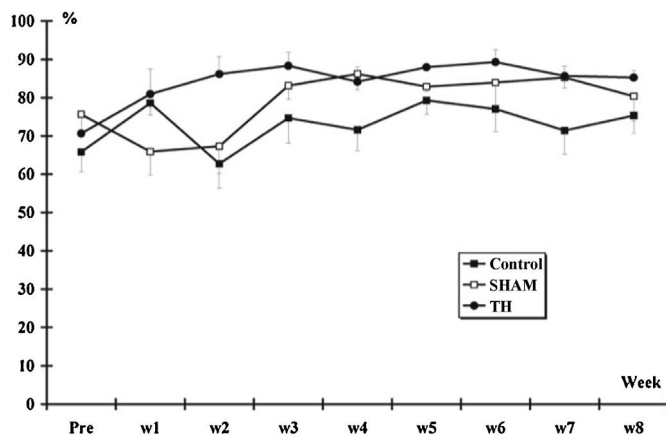
the capacity of eating, inducing weight loss [19]. However, other factors contribute to the observed weight loss because this phenomenon was also observed in MCAO rats without ECA damage [19]. Moreover, our observation is in accordance to previous studies indicating a minimal postoperative weight loss in SHAM group with the ECA transection. It was then postulated that the extensive corticostriatal damage was the most likely explanation of the weight loss following MCAO-r [20].

The weight loss is a general physiological state after cerebral infarction and was not just observed on the contralateral side to the lesion in our study. The weight changes seemed not to affect the body-weight distribution during static position on the four limbs. In addition, the weight of the Sham and Control animals increased during the protocol although the distribution of the body-weight was not changed during 8 weeks. Further studies need to explore the effect of the weight loss on the different weight distribution pattern (on two or three limbs).

The increase of the time spent on 3 paws after MCAO-r could be associated with a reduction of the left forepaw solicitation to maintain a static position. In other words, we observed, as subjective as it might be, some difficulties to move their left forelimb and therefore to use it for weight support. This phenomenon could be explained by the hemi-neglected contralateral limb to the cerebral lesion that was already observed following such trauma [21]. However, the pressure exerted on all fours was not disturbed after MCAO-r. Despite the fact that the occlusion was fixed at 2 h, the upper extremity paresis may not be severe enough [22] to be detected by the DWB system. Therefore, a permanent MCAO, inducing greater sensorimotor deficits, might lead to a postural instability that could be detected with the DWB test. It should be kept in mind that the DWB system holds the potential for further developments such as optimization of the captor sensibility.



**Fig. 5.** Pressure ratios after thoracic hemisection. (A) The sum of pressure exerted by the forepaws (F) normalized by the sum of pressure exerted by the hindpaws (H). (B) The pressure exerted by the left forepaw (LF) normalized by the pressure exerted by the right forepaw (RF). (C) The pressure exerted by the left hindpaw (LH) normalized by the pressure exerted by the right hindpaw (RH). Significant differences in the pressure ratios are indicated by \* (TH pre- vs. TH post-), + (Control vs. TH) and § (SHAM vs. TH). (One symbol  $p < 0.05$ ; 2 symbols  $p < 0.01$  and 3 symbols  $p < 0.001$ .)



**Fig. 6.** Time spent on 4 paws after thoracic hemisection. The time spent on all fours is expressed as a percentage of the total time spent on 3 and 4 paws.

#### 4.2.2. TH hemisection

Contrary to MCAO-r, the T<sub>10</sub> hemisection induced a decrease of the left hindpaw pressure. Surprisingly, the weight was not compensated by an increase of the right hindpaw pressure, but rather by an increase of the forepaw pressure. Indeed, contrary to healthy rats that put a third of their weight onto their forepaws, spinal cord hemisected rats placed up to half of their weight. Moreover, our data seemed to indicate that the additional weight supported by the forepaws is equally divided onto the right and left sides. Contrary to the BBB test that only summarizes the notion of weight-bearing as a hindlimb plantar support and excludes the forelimb contribution, the DWB system allows quantified measure of weight-bearing pressure on each paw [15].

We also showed that the time spent on 4 paws was increased after T<sub>10</sub> hemisection. This result might be explained by a lack of stability onto 3 paws. Moreover, the rat might not have enough force to lift its forelimbs due to their greater participation in the body weight support.

#### 4.3. What other behavioural tests could be used in complement to the DWB?

The DWB test specifically brings information about postural stability in static conditions without inducing fatigue. Therefore, additional behavioural tests could be performed in order to cover a broader scope of the complex rat sensorimotor behaviour [23].

DWB is known not to provide information on gait and stride [17]. Yet, gait analysis, which brings plentiful of information about neurological diseases, could easily be coupled with the DWB test. The CatWalk is an automated gait system built upon optical technologies that could provide information about kinematic impairments after such traumas [8,24].

The DWB test could also be coupled with a balance assessment such as the beam balance task. Indeed, it is a widely used technique to assess deficits of the vestibulomotor function in different traumatic afflictions [25]. We can also propose to associate the DWB test with the 'Inclined Plane' test that evaluates the ability of a rat to maintain its position on a tilted surface (slowly rotating the support until the animal loses grip) [26].

#### 4.4. Could the DWB inform us on other parameters that nociceptive information?

Initially, the analysis of the weight-bearing distribution was used as an index of pain based on the assumption that nociceptive inputs might alter paw weight distribution [16]. Indeed, in a neuropathic pain model the decrease in paw pressure of the affected limb displayed a high degree of correlation with the well-known pain indicator, the von Frey test [27]. However, the postural control structures, located in the brainstem and cerebellum, receive different afferent inputs that are not restricted to nociceptive information [26]. Therefore, plasticity resulting from stroke and spinal cord injuries could affect several types of afferent inputs (from muscles, joints, skin) disturbing supraspinal postural networks. Moreover, the pattern of spinal postural reflexes could also be modified by stroke or spinal cord injuries [28–30]. It may contribute to cause specific changes of basic body configuration [26].

#### 4.5. Conclusion

Our study showed that the DWB test should be used to assess both the severity of CNS trauma and the effectiveness of pharmacological and/or rehabilitation strategies. We strongly recommend continuing the investigation of postural instability by the use of



DWB test after different CNS traumas (different stroke models or contusion, compression at cervical or thoracolumbar levels).

### Acknowledgements

This work was supported by public [Aix-Marseille Université (AMU), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Agence Nationale de la Recherche (ANR – TRAUMATISM 09-BLAN-0295-02)] and private grants [Association Libre d'Aide à Recherche sur la Moelle Epinière (ALARME), Demain Debout and Combattre la Paralyse Associations]. We are grateful to Thelma COYLE for her help in Matlab data analysis. We are grateful to Jean-Pierre GRIMALDI for his help in technical support.

### References

- [1] Warlow C. Can neurologists influence stroke incidence, and do they? *Journal of the Royal College of Physicians of London* 1998;32:466–72.
- [2] Wyndaele M, Wyndaele JJ. Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? *Spinal Cord* 2006;44:523–9.
- [3] Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. *Experimental & Translational Stroke Medicine* 2010;2:13.
- [4] Metz GA, Merkler D, Dietz V, Schwab ME, Fouad K. Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats. *Brain Research* 2000;883:165–77.
- [5] Muir GD, Webb AA. Mini-review: assessment of behavioural recovery following spinal cord injury in rats. *The European Journal of Neuroscience* 2000;12:3079–86.
- [6] Lipsanen A, Jolkkonen J. Experimental approaches to study functional recovery following cerebral ischemia. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 2011;68:3007–17.
- [7] Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, Bland ST. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology* 2000;39:777–87.
- [8] Li S, Shi Z, Zhang H, Liu X, Chen S, Jin J, et al. Assessing gait impairment after permanent middle cerebral artery occlusion in rats using an automated computer-aided control system. *Behavioural Brain Research* 2013;250:174–91.
- [9] Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiologica* 2011;201:275–87.
- [10] Virley D, Beech JS, Smart SC, Williams SC, Hodges H, Hunter AJ. A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behavior. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2000;20:563–82.
- [11] Arvanian VL, Schnell L, Lou L, Golshani R, Hunanyan A, Ghosh A, et al. Chronic spinal hemisection in rats induces a progressive decline in transmission in uninjured fibers to motoneurons. *Experimental Neurology* 2009;216:471–80.
- [12] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke: A Journal of Cerebral Circulation* 1989;20:84–91.
- [13] Uluc K, Miranpuri A, Kujoth GC, Akture E, Baskaya MK. Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *Journal of Visualized Experiments: JoVE* 2011;48:1–5.
- [14] Menzies SA, Hoff JT, Betz AL. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery* 1992;31:100–6.
- [15] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma* 1995;12:1–21.
- [16] Bove SE, Calcaterra SL, Brooker RM, Huber CM, Guzman RE, Juneau PL, et al. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage/OARS, Osteoarthritis Research Society* 2003;11:821–30.
- [17] Tetreault P, Dansereau MA, Dore-Savard L, Beaudet N, Sarret P. Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiology & Behavior* 2011;104:495–502.
- [18] Zvejniec L, Svalbe B, Liepinsh E, Pulks E, Dambrova M. The sensorimotor and cognitive deficits in rats following 90- and 120-min transient occlusion of the middle cerebral artery. *Journal of Neuroscience Methods* 2012;208:197–204.
- [19] Dittmar M, Spruss T, Schuierer G, Horn M. External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke: A Journal of Cerebral Circulation* 2003;34:2252–7.
- [20] Virtanen T, Jolkkonen J, Sivenius J. Re: External carotid artery territory ischemia impairs outcome in the endovascular filament model of middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke: A Journal of Cerebral Circulation* 2004;35:e9–10, author reply e9–10.
- [21] Reep RL, Corwin JV, Cheatwood JL, Van Vleet TM, Heilman KM, Watson RT. A rodent model for investigating the neurobiology of contralateral neglect. *Cognitive and Behavioral Neurology: Official Journal of the Society for Behavioral and Cognitive Neurology* 2004;17:191–4.
- [22] Kleim JA, Boychuk JA, Adkins DL. Rat models of upper extremity impairment in stroke. *ILAR Journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 2007;48:374–84.
- [23] Sedy J, Urdzikova L, Jendelova P, Sykova E. Methods for behavioral testing of spinal cord injured rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2008;32:550–80.
- [24] Hamers FP, Koopmans GC, Joosten EA. CatWalk-assisted gait analysis in the assessment of spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 2006;23:537–48.
- [25] Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H, Schmid-Elsaesser R. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Research* 2000;863:94–105.
- [26] Deliagina TG, Orlovsky GN, Zelenin PV, Beloozerova IN. Neural bases of postural control. *Physiology* 2006;21:216–25.
- [27] Vrinten DH, Hamers FF. 'CatWalk' automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat: a comparison with von Frey testing. *Pain* 2003;102:203–9.
- [28] DeVries AC, Nelson RJ, Traystman RJ, Hurn PD. Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2001;25:325–42.
- [29] Dietz V, Muller R, Colombo G. Locomotor activity in spinal man: significance of afferent input from joint and load receptors. *Brain: A Journal of Neurology* 2002;125:2626–34.
- [30] Lyalka VF, Orlovsky GN, Deliagina TG. Impairment of postural control in rabbits with extensive spinal lesions. *Journal of Neurophysiology* 2009;101:1932–40.

# Acute Neuromuscular Adaptation at the Spinal Level Following Middle Cerebral Artery Occlusion-Reperfusion in the Rat

Caroline Pin-Barre<sup>1,2</sup>, Jérôme Laurin<sup>1\*</sup>, Marie-Solenne Felix<sup>1</sup>, Vincent Pertici<sup>1</sup>, Frank Kober<sup>4</sup>, Tanguy Marqueste<sup>1</sup>, Valery Matarazzo<sup>3</sup>, Françoise Muscatelli-Bossy<sup>3</sup>, Jean-Jacques Temprado<sup>1</sup>, Jeanick Brisswalter<sup>2</sup>, Patrick Decherchi<sup>1</sup>

**1** Aix-Marseille Université, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut des Sciences du Mouvement, Faculté des Sciences du Sport, Marseille, France, **2** Université de Nice Sophia-Antipolis et Université du Sud Toulon-Var, Motricité Humaine Éducation Sport Santé, Nice, France, **3** Aix-Marseille Université, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut de Neurobiologie de la Méditerranée, Marseille, France, **4** Aix-Marseille Université, Centre National de la Recherche Scientifique, Centre de Résonance Magnétique Biologique et Médicale, Faculté de Médecine Timone, Marseille, France

## Abstract

The purpose of the study was to highlight the acute motor reflex adaptation and to deepen functional deficits following a middle cerebral artery occlusion-reperfusion (MCAO-r). Thirty-six Sprague-Dawley rats were included in this study. The middle cerebral artery occlusion (MCAO; 120 min) was performed on 16 rats studied at 1 and 7 days, respectively (MCAO-D1 and MCAO-D7,  $n=8$  for each group). The other animals were divided into 3 groups: SHAM-D1 ( $n=6$ ), SHAM-D7 ( $n=6$ ) and Control ( $n=8$ ). Rats performed 4 behavioral tests (the elevated body swing test, the beam balance test, the ladder-climbing test and the forelimb grip force) before the surgery and daily after MCAO-r. H-reflex on *triceps brachii* was measured before and after isometric exercise. Infarction size and cerebral edema were respectively assessed by histological (Cresyl violet) and MRI measurements at the same time points than H-reflex recordings. Animals with cerebral ischemia showed persistent functional deficits during the first week post-MCAO-r. H-reflex was not decreased in response to isometric exercise one day after the cerebral ischemia contrary to the other groups. The motor reflex regulation was recovered 7 days post-MCAO-r. This result reflects an acute sensorimotor adaptation at the spinal level after MCAO-r.

**Citation:** Pin-Barre C, Laurin J, Felix M-S, Pertici V, Kober F, et al. (2014) Acute Neuromuscular Adaptation at the Spinal Level Following Middle Cerebral Artery Occlusion-Reperfusion in the Rat. PLoS ONE 9(2): e89953. doi:10.1371/journal.pone.0089953

**Editor:** Lucio Annunziato, University of Naples Federico II, Italy

**Received:** October 30, 2013; **Accepted:** January 24, 2014; **Published:** February 28, 2014

**Copyright:** © 2014 Pin-Barre et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** The authors have no support or funding to report.

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

\* E-mail: jerome.laurin@univ-amu.fr

## Introduction

To date, stroke rehabilitation and pharmacological treatments cannot ensure a complete functional recovery after stroke [1,2]. Therefore, stroke survivors frequently preserve, among others, major chronic sensory and motor dysfunctions. To assess treatments and discover new ones, the understanding of the neural adaptation mechanisms underlying the functional impairments seems to be essential [3]. The neural mechanisms induced by stroke refer to both neuronal damages and consecutive neuromuscular adaptations around and below the lesion site (including the neural network reorganization both in the spinal cord and in the spared cerebral structures). However, these mechanisms remain poorly understood.

To explore the underlying neural adaptation, several experimental models of focal cerebral ischemia were commonly used in rats. The “Middle Cerebral Artery Occlusion-reperfusion” (MCAO-r) is one of the most frequently used cerebral ischemia method to study the neuronal death mechanisms and the severity of functional outcomes by the use of several behavioral tests [4–6]. There is a growing consensus that the effective evaluation of therapies in the rat MCAO-r model requires combination of histological measurements and behavioral tests. Indeed, studies

showed functional disturbances after ischemia despite normal or near-normal histology [7]. Moreover, some others demonstrated that pharmacological treatments appeared to be ineffective based on measurement of infarct volume but were found to significantly improve functional outcome [8,9].

However, two major limitations hampered the understanding of the pathophysiology of MCAO-r. On one hand, although the overall behavioral tests enabled to detect disorders of the motor control [5,10–12], they could not determine spinal and supraspinal mechanisms responsible of the specific neural adaptation to MCAO-r. Moreover, some functional outcomes concerning the forelimbs stay controversial and need to be deepened. It is the case of the effect of cerebral ischemia on the grip force of the forelimbs, which is an important functional disorder after stroke. Indeed, several authors showed a decline in force production whereas other rat studies indicated an increase of grip force following MCAO-r [13,14]. On the other hand, the amount of necrotic tissue in the primary infarct site is only considered to be one factor influencing functional recovery [5,10–12]. As behavioral tests, histological measurements could not inform on the underlying neuromuscular alterations affecting the contralateral limbs to the cerebral ischemia [15].

The motor reflex regulation at the spinal level is recognized as an important aspect of the motor control and may be modulated by cerebral ischemia, despite the fact that controversial results remain for the upper-extremity control in human studies [16–19]. The Hoffmann reflex (H-reflex) has often been used in preclinical human and animal studies to explore the spinal sensorimotor adaptation during and/or after skeletal muscle activity [20,21]. The H-reflex pathway is well-known not to be exclusively affected by afferent inputs from agonist/antagonist muscles and joints, but also, by descending motor pathways during movement [22]. However, no evidence indicates that muscular exercise-induced spinal sensorimotor adaptation could be changed by the MCAO-r in rats.

Hence, the present study was designed to assess the acute adaptation of the spinal motor reflex during the 1<sup>st</sup> week following MCAO-r. For that purpose, the spinal sensorimotor adaptation was assessed by measuring the response of *triceps brachii* H-reflex before and after isometric exercise on this muscle. It is important to indicate that physical exercise can be used as a diagnostic tool revealing new changes in neuromuscular mechanisms adaptations that cannot be observed in resting condition. Indeed, physical exercise, as prolonged isometric contraction, was known to activate the excitatory and/or inhibitory mechanisms responsible of the motor unit recruitment [23]. In addition, this study aimed at deepening functional deficits knowledge following MCAO-r that needs to be clarified. Reproducibility and lesion size at the right hemisphere level were quantified by histological and magnetic resonance imagery analysis.

In our study, the different measurements were performed during the first week post-MCAO-r because the lesion size mainly evolved during this acute period in rat model [24]. It was demonstrated that the peak of cerebral damages occurred 24 hours after the lesion [24–26]. Several studies also indicated that the cerebral lesion size began to be stable from the 7<sup>th</sup> days [27–29]. In addition, the processes of cerebral neuronal plasticity were initiated during the first 24 hours and were increasingly active during several days post-cerebral ischemia [29,30]. It is noteworthy to add that the first day post-MCAO-r was considered to be an optimal time point to start pharmacological treatment or functional rehabilitation due to the opportune plasticity processes [3,29,31,32].

## Materials and Methods

### 1. Animals

Fifty adult male Sprague Dawley rats, weighing exclusively between 250–270 g (Centre d'Élevage Roger JANVIER, Le Genest Saint Isle, France), were singly housed in smooth-bottomed plastic cages in a colony room maintained on a 12-h light/dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. Animals weighting more than 270 g were excluded from the study. The room temperature was maintained at 22°C. The weight of the rats was daily controlled. In order to accustom the animals to the laboratory environment, an acclimation period of 2 weeks was allowed before the initiation of the experiment.

**Ethics statement.** Anesthesia and surgical procedures were performed according to the French law on animal care guidelines and the Animal Care Committees of Aix-Marseille Université (AMU) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) approved our protocols. Furthermore, experiments were performed following the recommendations provided in the *Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health) and in accordance with the European Community council directive of 24 November 1986

(86/609/EEC). No sign of screech, prostration and hyperactivity were observed through the experiment.

Among the 50 rats, 30 of them underwent MCAO-r surgery and the 16 survivors were equally distributed into the MCAO-D1 and the MCAO-D7 groups, as indicated below. Thus, the survival rate after MCAO-r surgery, comprising the rats of both MCAO-D1 and MCAO-D7 groups, was 53.3%. Consequently, the remaining 36 animals were randomly assigned to the following 5 groups: 1) Control (n = 8), 2) MCAO-D1 group (n = 8) in which electrophysiological, histological and magnetic resonance imagery (MRI) recordings were realized 1 day after MCAO-r, 3) MCAO-D7 group (n = 8) in which electrophysiological, histological and MRI recordings were realized 7 days after MCAO-r, 4) SHAM-D1 group (n = 6) in which electrophysiological, histological and MRI recordings were realized 1 day after the surgery without the MCAO-r step and 5) SHAM-D7 group (n = 6) in which electrophysiological, histological and MRI recordings were realized 7 days after the surgery without the MCAO-r step.

### 2. Surgical procedure: cerebral ischemia by MCAO-r

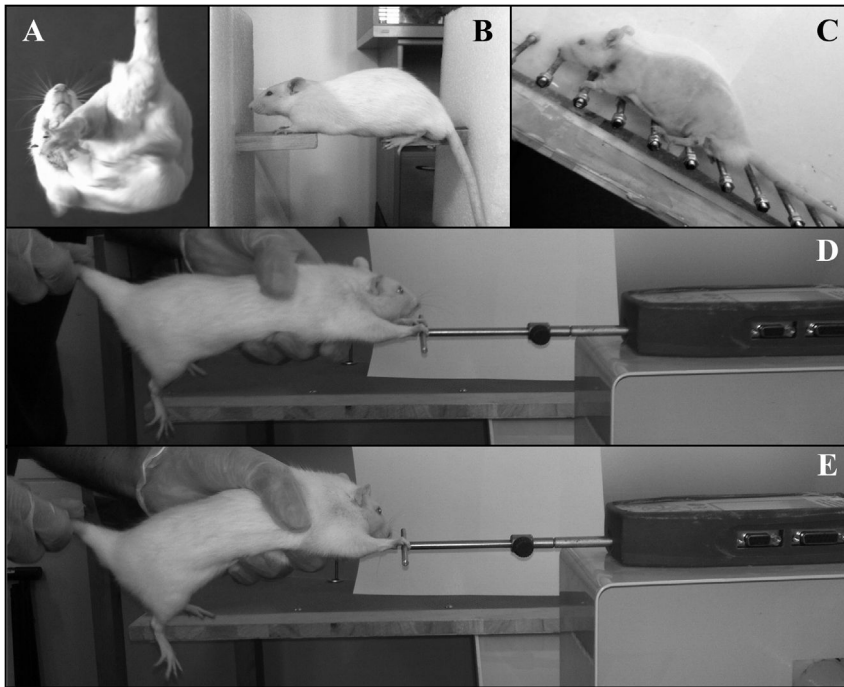
It is important to note that reproducibility of the induced deleterious effects by the surgery could be optimized by rigorously controlling temperature, weight, age, sex, type of used rat and ischemia duration [33]. Central temperature was maintained at about 37–38°C with a homeothermic blanket (Homeothermic Blanket Control Unit, K01345CE, Holliston, MA, USA) driven by a rectal thermal probe.

Briefly, as described in previous studies [34,35], anaesthesia was induced with 5% isoflurane and maintained with 2.5–2% isoflurane through a facemask (Anestéo, Villette, France), supplemented with oxygen. A 0.2 ml injection of 0.5% bupivacaine was subcutaneously performed along the prospective incision site. A 4 cm ventral midline incision was performed and the right external, internal, and common carotid arteries (ECA, ICA, CCA) were exposed without damaging the vagus nerve and its collaterals. After a partial arteriotomy on ECA with micro-scissors, a 4-0 monofilament nylon suture (total length: 3 cm; silicon-coated tip length and diameter: 5 mm and 0.39±0.02 mm respectively; MCAO suture PK10, 40-333PK10, Redland, CA, USA) was inserted into the ICA via the ECA and approximately pushed 20 mm away from the carotid bifurcation. Blood flow was thus blocked at the MCA origin. After 120 min of occlusion, the monofilament was carefully removed and the ICA was permanently closed by electrocoagulation to prevent bleeding. Finally, the skin was sutured and animals returned in individual cages.

### 3. Behavioral tests

The severity of functional outcomes following MCAO-r was assessed by the use of 4 behavioral tests. It also allowed us to test the reliability of the cerebral ischemia on functional outcomes between animals (**Figure 1**).

**Elevated body swing test (EBST).** The EBST reflects the lateralization of the lesion (asymmetrical motor behavior) (**Figure 1A**). The animal was held approximately 1 cm from the base of its tail [36]. It was then elevated above the surface in the vertical axis. A swing was recorded whenever the animal moved its head out of the vertical axis to either the left or the right side (more than 10 degrees). Before attempting another swing, the animal was momentarily placed back on the ground of his cage. Ten swings were performed for each recording session. The overall number of swings made to the left side was divided by the overall number of swings made to both sides. For example, if the animal performed 7 swings on the left side and 3 swings on the



**Figure 1. Illustration of the behavioral tests.** **A.** The elevated body swing, **B.** The balance test on 2 wooden beams, **C.** The ladder-climbing test, **D.** The grip force test with both forelimbs and **E.** The grip force test with only one forelimb (in this example, the right forelimb). doi:10.1371/journal.pone.0089953.g001

right side, the score was 7/10 (left swing number/total swing number = 0.7)

**Beam balance test.** The beam balance task is a widely used technique to assess deficits of the vestibulomotor function in different traumatic situations [37]. The beam balance test in static position is considered not to be sensitive enough to detect vestibulomotor alteration after cerebral ischemia [10,37]. In the present study, this task was modified to increase its sensitivity in order to detect balance deficits. The forelimbs and the hindlimbs were respectively positioned on distinct narrow wooden beams (diameter: 28 mm; space length: 5 cm) (**Figure 1B**). Therefore, rats could only balance themselves using their 4 paws excluding any other body part support. The time to fall off the rod was recorded. The animals performed 2 trials with a maximum time fixed at 60 s. Finally, the total recording time was calculated by adding the time of the two trials.

**Ladder-climbing test.** The ladder-climbing test is used to evaluate the sensorimotor capacities to correctly grip the rung while rats climbed up a inclined ladder (**Figure 1C**) [38]. In our study, the ladder was inclined to a 45° angle (length: 100 cm; width scale: 13 cm). The animals walked across the inclined ladder with rungs of equal spacing (1 cm). The rats performed 4–5 trials per testing session. The video analysis of the left paw grip was recorded with a 100-Hz acquisition frequency using SimiMotion software (Unterschleissheim, Germany) associated with a numerical camcorder (MV 830i; Canon, Courbevoie, France). The number of grips of the left paw was counted (20 steps minimum). Then, the number of mistakes, misses or slips, per crossing was taken into account. If the grip on the rung was correct, the score was 2 points. If the rung was completely missed by the left forepaw, the score was 0 point. If the paw slipped on the rung or the grip was incomplete, the score was 1 point. Moreover, if the left paw touched intermediate rungs during the swing phase, the score was also 1 point. For each testing session, the successful score

was normalized with the maximal score, depending on the number of performed steps. Results were expressed as percentage of PRE-values. For example, if the animal performed 40 steps (maximal score = 80) and the score including mistakes was 45, the result was 45/80 (successful score = 56%).

**Forelimb grip force.** The grip force exerted by both forepaws together and by each forepaw was measured by using a grip force tester [Grip Strength Tester (GST) bio-GT3, Bioseb, Vitrolles, France] (**Figure 1D**). The same experimenter performed all the grip force measurements to obtain more reproducible and reliable data. To standardize the assessment of grip force, the rat was held by the base of the tail above the bar and was then moved down until its forelimbs grasped the middle of the bar. While the body and the lower limbs were horizontally maintained, the experimenter pulled the rat following the axis of the sensor (horizontally) until the grasp was released. The trial ended when the rat released the bar (or failed to establish grip on the GST bar). During each trial, the maximum force developed by the rat was obtained just before grip was released. An individual testing trial lasted 5–7 s. The time interval between each trial was fixed to 1 min to avoid fatigue accumulation. A positive grip was scored when the digits extended and then flexed upon contacting the bar followed by the digits being extended when the rat released the bar. In each session, 15–20 trials were performed and the 4 maximal forces (in grams) were averaged. Moreover, results were normalized by the weight of the animal (force/weight ratio).

The grip force independently exerted by each paw was measured with the same experimental procedure, except that the experimenter held the contralateral paw during the trial to ensure that the latter paw did not influence the result of the other paw. As previously mentioned, 15–20 trials were performed and the 4 maximal trials per session were averaged. The left forelimb force was then normalized by the right forelimb force (L/R ratio). Finally, each forelimb force was also normalized by the weight of

the rat (ForceL/Weight ratio, for the left forepaw; ForceR/Weight ratio, for the right forepaw).

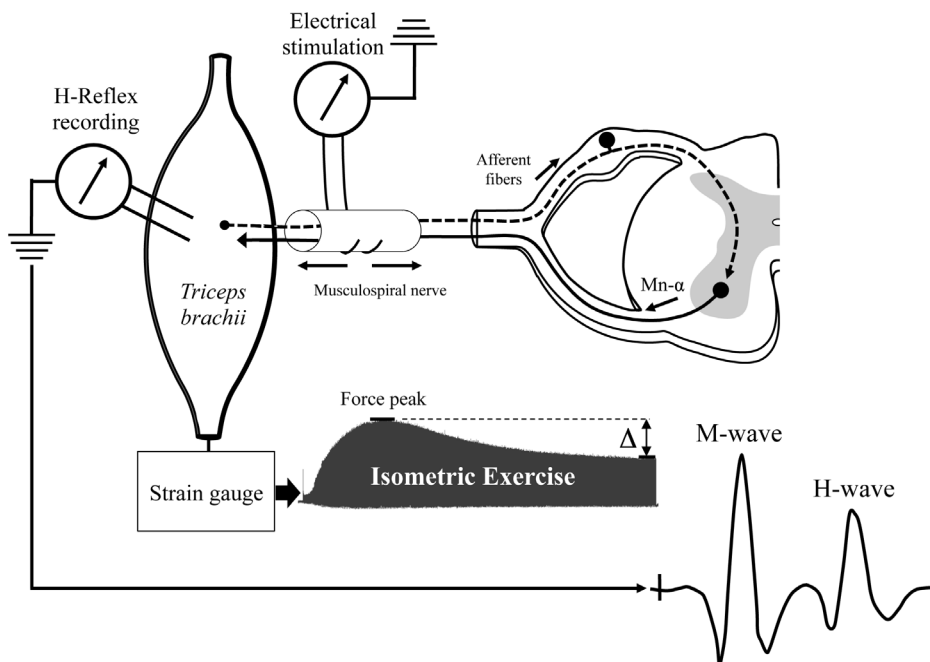
#### 4. Electrophysiological measurements

**Animal preparation.** Rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of urethane solution (100 mg/100 g). Central temperature was maintained at about 38°C with a homeothermic blanket driven by a rectal thermal probe. Animals were positioned in dorsal *decubitus* during the surgery and all neuromuscular measurements. The shoulder and elbow were firmly held by clamps on a horizontal support to avoid disturbing movements and to maintain the 120° elbow joint angle during electrical nerve stimulations. The *pectoralis major* and *minor* muscles were removed and the left *musculospiral* nerve, innervating the *triceps brachii* muscle, was dissected free from surrounding tissues over a length of 3–4 cm. The other nerves of the brachial plexus were sectioned. Strain gauge was fixed at the wrist level and was opposed to the arm movement induced by nerve electrical stimulation.

**Isometric exercise.** The isometric exercise was characterized by a series of *triceps brachii* isometric contraction evoked by electrical *musculospiral* nerve stimulation (duration: 1 ms; frequency: 10 Hz). A constant current neurostimulator (Digitimer DS7 A; Welwin, Garden City, Hertfordshire, UK) delivered single rectangular shocks to the *musculospiral* nerve using a pair of steel hooks. The current intensity used to evoke maximal twitch amplitude was measured from the beginning of the curve to the peak. The intensity of the isometric exercise was fixed to 25% of the twitch amplitude. To measure *triceps brachii* muscle isometric force, a wire connected to a strain gauge (Microdynamometer S 60; Houston, TX, USA) was perpendicularly fixed around the wrist. Contractions were recorded with Biopac MP150 system (sampled at 2,000 Hz, filtered with low pass at 150 Hz) and analyzed with Biopac AcqKnowledge 3.9 software (Goleta, USA). The isometric exercise was interrupted when the force fell to 50% of its peak value (**Figure 2**). The time of the exercise was measured.

**H-reflex response before and after isometric exercise.** The H-reflex was used to assess the spinal sensorimotor adaptation after MCAO-r by peripheral nerve stimulation. In our study, the *triceps brachii* H-reflex was evoked before and after an isometric exercise. To evoke the M and H-waves, single rectangular shocks were directly applied to the intact *musculospiral* nerve using a pair of steel hooks with a 1-msec pulse generated by a constant current stimulator. Stimulation electrodes were located at ~4 mm of the nerve insertion into the muscle. In accordance with a previous study [39], the stimulation frequency was fixed at 0.1 Hz to abolish the post-activation depression during the consecutive H-reflexes recording. The H-reflex was recorded using bipolar needle electrodes (29-gauge; Oxford, UK; MLA 1204 needle electrodes, 2-mm pin) inserted into the belly of the *triceps brachii* muscle. It is noteworthy to add that the location of the electrodes was never changed throughout the H-reflex recordings (between the PRE-exercise and the POST-exercise measurements). The *triceps brachii* was selected because it seemed to be more appropriate than the other forelimb muscles. Being large and thick, it facilitates the location of EMG electrodes. Furthermore, because muscle length is known to influence H-reflex amplitude, all evoked potentials were recorded for a given elbow angle (i.e., 110°) [40]. The reflex signal was referred to a ground electrode implanted in an inert tissue, amplified (2k), and filtered (30 Hz to 10 kHz) with a differential amplifier (P2MP, 5104B, Marseille, France). The experimental design for H-reflex recording is shown in **Figure 2**.

The stabilized maximal M-wave ( $M_{max}$ ) and H-wave ( $H_{max}$ ) peak-to-peak amplitudes were determined by incrementally increasing stimulation intensity (by 0.01-mA increments) from 0 mA until there was no further wave amplitude increase. Stimulation intensity was fixed to obtain  $H_{max}$  and  $M_{max}$ . Then, five H-reflexes were evoked before and five other H-reflexes were elicited after the isometric exercise. The  $H_{max}/M_{max}$  ratio was then calculated for each evoked H-reflex and averaged. Changes



**Figure 2. Schematic experimental procedure to evoke H-reflex and triceps brachii isometric exercise by musculospiral nerve stimulation.**

doi:10.1371/journal.pone.0089953.g002

in  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio after exercise were expressed as percentage of the corresponding  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio before exercise.

## 5. Histology

**Transcardiac perfusion.** After electrophysiological recordings, the left cardiac ventricle was exposed and drilled. All animals were then perfused transcardially (25 ml/min) with 250–300 ml of 0.1 M ice-cold phosphate buffer ( $7.2 < \text{pH} < 7.4$ ) and followed by the same volume of 4% phosphate-buffered paraformaldehyde (pH 7.4). Tissues were immediately dissected, post-fixed for 2 h at  $4^{\circ}\text{C}$  in the same fixative buffer and cryoprotected 24 h at  $4^{\circ}\text{C}$  in 30% sucrose. Tissues were then snap-frozen at  $-40^{\circ}\text{C}$  for 10 s in Isopentane solution and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  [41]. The next step consisted to perform coronal sections of rat brain (slide thickness: 30  $\mu\text{m}$ ).

**Cresyl violet staining.** Cresyl violet staining is commonly used method to quantify experimental brain infarctions. Sections were rinsed in distilled water for 5 min and incubated 3 min in a cresyl violet bath. Sections were then dehydrated through a sequence of ethanol baths (70, 95, and 100%). Sections were finally cleaned in Xylene during 2 min and medium mounted with coverslip using Permount (Fair Lawn, NJ, USA). For each section, the infarction area and total area of each hemisphere were delimited and calculated with ImageJ software [42].

## 6. Magnetic Resonance Imagery (MRI)

Anesthesia was induced with 5% isoflurane and maintained with 2–2.5% isoflurane through a facemask, supplemented with oxygen. The MRI experiments were performed in a horizontal Bruker Biospec 4.7-T (Bruker Biospec Avance 4.7T/30, Bruker, Ettlingen, Germany). The core temperature was maintained close to  $37^{\circ}\text{C}$  by circulating warm water in a heating pad placed under the torso. Breathing rate was also monitored throughout the MRI study. The animal head was secured by ear and tooth bars to limit movement. Then, the surface coil was placed above the head for brain imaging. Two types of measurements were performed: 1) Twenty coronal slices were from  $T_2$  weighing (contiguous slices; TE: 50 ms; slice thickness: 1 mm; matrix:  $256 \times 256$  pixels; field of view:  $40 \times 40 \text{ mm}^2$ ). By the use of the ImageJ software, the regions of interest were selected manually. The edema volume was compared to the right hemisphere volume and to the total brain volume. 2) Twenty coronal slices were from  $T_2^*$  weighing (contiguous slices; TE: 15 ms; idem for the other parameters) to observe blood accumulation (intracerebral hemorrhages) [43].

## 7. Experimental protocol

In a first step, rats were familiarized with the elevated body swing test, the beam balance test, the ladder-climbing test and the forelimb grip force by training them 4 times a week during 1 week. Then these behavioral tests were realized once before the surgery (PRE) and daily after it from the 1<sup>st</sup> day to the 7<sup>th</sup> day (D1, D2, D3, D4, D5, D6 and D7). The H-reflex recordings before and after isometric exercise were performed at D1 for MCAO-D1 and SHAM-D1 groups, but also, at D7 for MCAO-D7 and SHAM-D7 groups. Finally after electrophysiological measurements, the size of cerebral infarction was measured by histological analysis with Cresyl violet staining. To be more complete, the size of cerebral edema was measured by MRI on 1 Control rat, 1 SHAM rat and 2 MCAO-r rats at D1 and D7.

## 8. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SigmaStat software program (Statistical software, San Jose, CA, USA). All data are

presented as Mean  $\pm$  SD and where compared by ANOVA tests. Post-hoc comparisons were performed with Student-Newman-Keuls multiple post-test comparisons. Results were considered statistically significant, highly significant or very highly significant if the p-value fell below 0.05, 0.01 and 0.001, respectively.

## Results

The rat weight decreased between 11% and 19% after MCAO-r throughout protocol duration while the weight of SHAM rats was similar to the one of Control rats.

No difference was observed from PRE to D7 in Control and SHAM-D7 groups for all the measured behavioral parameters, except for grip force (g) in SHAM-D7 (see below: 4.). Likewise, no difference was observed between these 2 groups.

Results of the behavioral assessment obtained in MCAO-D1 group were similar to the ones of the MCAO-D7 group at D1 (MCAO-D1 group results, see **Table 1**). No difference was observed between Control and SHAM-D1 groups.

### 1. Elevated body swing test (EBST)

The animals exclusively straightened up on the left side during the 7 days post-MCAO-r. Indeed, the left swing number/total swing number was significantly higher from D1 to D7 compared to PRE in MCAO-D7 group (PRE =  $0.6 \pm 0.17$ ; from D1 to D7 = 1;  $p < 0.001$ ). (**Figure 3**). The left swing number/total swing number observed in the MCAO-D7 group was significantly higher than Control and SHAM-D7 groups from D1 to D7 ( $p < 0.001$ ).

### 2. Beam balance test

The balance deficits persisted after 7 days post-MCAO-r. The balance time on the rod in the MCAO-D7 group from D1 to D7 was strongly inferior to PRE values ( $p < 0.001$ ) (**Figure 4**). However, the balance time was significantly higher from D4 to D7 ( $36 \pm 39$  s;  $67 \pm 39$  s;  $58 \pm 32$  s;  $76 \pm 34$  s respectively) compared to D1, D2 and D3 ( $p < 0.001$ ). The balance time was significantly shorter from D1 to D7 in MCAO-D7 than Control and SHAM-D7 groups ( $p < 0.001$ ).

### 3. Ladder-climbing test

The animals showed strong difficulties to climb and grip the ladder with the left paw during 7 days post-MCAO-r. Indeed, the successful score significantly decreased from D1 to D7 in MCAO-D7 group compared to PRE ( $p < 0.001$ ) (**Figure 5**). Moreover, the successful score was significantly higher from D5 to D7 ( $0.44 \pm 0.09$ ;  $0.57 \pm 0.14$ ;  $0.59 \pm 0.12$  respectively) compared to D1-D4 ( $0.21 \pm 0.20$ ;  $0.19 \pm 0.13$ ;  $0.16 \pm 0.18$ ;  $0.20 \pm 0.22$  respectively;  $p < 0.001$  for all values). The successful score was significantly lower in MCAO-D7 group from D1 to D7 than Control and SHAM-D7 groups ( $p < 0.001$ ).

### 4. Forelimb grip force

The force decreased after MCAO-r but increased when the force was normalized to the body weight.

**Changes in grip force exerted by both forepaws throughout protocol.** The force (g) significantly increased in SHAM-D7 group at D3, D4, D6 and D7 ( $1148 \pm 143$  g;  $1148 \pm 160$  g;  $1123 \pm 186$  g;  $1135 \pm 158$  g respectively,  $p < 0.05$ ) compared to PRE ( $994 \pm 58$  g). However, when the force was normalized by the rat's weight (force/weight), no difference was observed in SHAM-D7 group during the protocol, as in Control group. A decrease of force for the MCAO-D7 group was noticed between PRE and D2, D4, D5, D6, D7 whereas no difference was observed at D1 and D3 ( $927 \pm 53$  g;  $881 \pm 92$  g respectively,

**Table 1.** Behavioral tests for Control, SHAM-D1 and MCAO-D1 groups.

	Control		SHAM-D1		MCAO-D1	
	PRE	D1	PRE	D1	PRE	D1
Elevated body swing test	0.5±0.2	0.5±0.2	0.52±0.13	0.58±0.13	0.5±0.13	1 <sup>+/*</sup>
Ladder-climbing test	0.93±0.05	0.96±0.03	0.94±0.05	0.91±0.04	0.94±0.02	0.43±0.18 <sup>+/*</sup>
Beam balance test	120	120	120	120	120	0 <sup>+/*</sup>
Force with 2 the forepaws (g)	853±87	930±124	939±85	967±135	943±105	883±99
Force/Weight ratio	3.5±0.2	3.6±0.3	3.6±0.3	3.7±0.3	3.7±0.4	4.0±0.5 <sup>+/*</sup>
Force L/R ratio	0.92±0.09	1.00±0.14	0.96±0.09	0.98±0.12	1.09±0.08	0.69±0.07 <sup>+/*</sup>

The PRE and D1 values are represented. \* indicates significant differences between PRE and D1 (p<0.001). + indicates significant differences between MCAO-D1 group and the 2 other groups (p<0.001).

doi:10.1371/journal.pone.0089953.t001

p = 0.07)(Figure 6A). However, the force/weight ratio was increased in MCAO-D7 group at D1, D3, D4, D5, D6 and D7 (927±53 g; 881±92 g; 847±27 g; 849±57 g; 821±75 g; 837±67 g respectively; p<0.05) compared to PRE (963±80 g)(Figure 6B). Moreover, the observed force at D1 in MCAO-D7 group was significantly higher than the force at D2 (p<0.05).

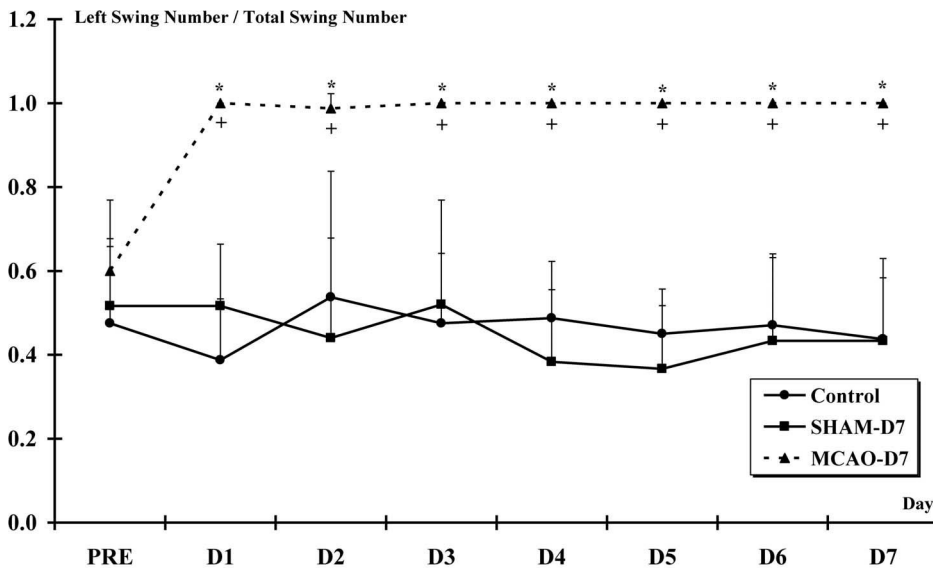
**Changes in grip force exerted by both forepaws between groups.** The force in MCAO-D7 group was significantly lower from D2 to D7 than Control (p<0.01) and SHAM-D7 (p<0.001) groups, except at D3 where the force in MCAO-D7 group was only lower than SHAM-D7 group (p<0.001)(Figure 6A). The force/weight ratio for MCAO-D7 group was higher at D5, D6 and D7 than the force/weight ratio for Control (p<0.01, p<0.01 and p<0.001 respectively) and for SHAM-D7 groups (p<0.05, p<0.05 and p<0.01 respectively)(Figure 6B).

**Changes in grip force exerted by each forepaws.** As described below, the modified grip force production was associated with a force decline of the left forelimb and an increase of right forelimb force.

**The L/R ratio (Left/Right).** The PRE L/R ratio of the MCAO-D7 group significantly decreased compared to the D1 and D2 L/R ratio (PRE: 1.1±0.1; D1 and D2: 0.8±0.1; p<0.001 for both) (Figure 7). The L/R ratio in the MCAO-D7 group was lower than in the Control at D1 and D2 (PRE: 0.9±0.04; D1: 0.9±0.1; D2: 1.0±0.1; p<0.01 for both) and in the SHAM-D7 (PRE: 0.9±0.1; D1: 1.0±0.1; D2: 1.0±0.2; p<0.001 for both) groups.

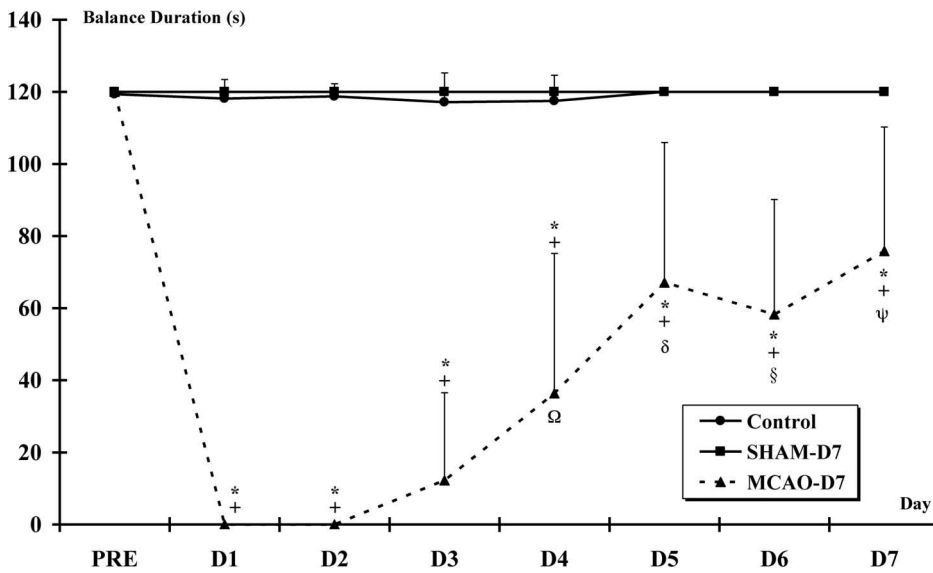
**The left forepaw force.** The force in the MCAO-D7 group was significantly lower from D1 to D7 (358±36 g; 344±54 g; 356±57 g; 342±81 g for D1, D2, D6 and D7 respectively; p<0.001; 419±32 g; 387±55 g; 390±41 g for D3, D4 and D5 respectively; p<0.05) compared to PRE (475±51 g). The ForceL/Weight ratio significantly decreased at D1 (p<0.01) and D2 (p<0.001) compared to D3 in MCAO-D7 group (data not shown). The force (g) in MCAO-D7 group was significantly lower than Control and SHAM-D7 groups from D1 to D7 (p<0.05), except for D3 (data not shown).

**The right forepaw force.** Contrary to the force decline observed at D7 compared to PRE (450±38 g, p<0.05), D1



**Figure 3. The elevated body swing test.** This test is used to assess the lateralization of the lesion (asymmetrical motor behavior). \* indicates a significant increase for the left swing number/total swing number ratio for MCAO-D7 group between PRE and from D1 to D7 (p<0.001). + indicates a significant increase for the left swing number/total swing number ratio for MCAO-D7 group compared to Control and SHAM-D7 groups from D1 to D7 (p<0.001).

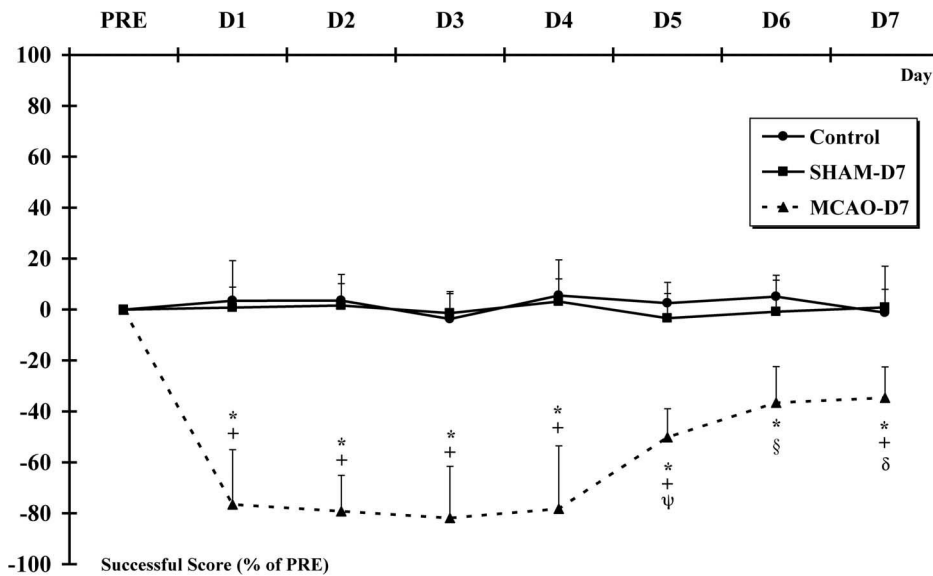
doi:10.1371/journal.pone.0089953.g003



**Figure 4. Beam balance test.** The beam balance task is used to assess deficits of the vestibulomotor function after MCAO. \* indicates a significant decrease in the balance duration for MCAO-D7 group between PRE and from D1 to D7 ( $p < 0.001$ ). + indicates a significant decrease in the balance duration for MCAO-D7 group compared to Control and SHAM-D7 groups from D1 to D7 ( $p < 0.001$ ). For the MCAO-D7 group:  $\Omega$  indicates a significant difference between D4 and D1 to D3;  $\delta$  indicates a significant difference between D5 and D1 to D4;  $\S$  indicates a significant difference between D6 and D1 to D4 ( $p < 0.001$  for all);  $\psi$  indicates a significant difference between D7 and D1 to D4 ( $p < 0.001$  for all). doi:10.1371/journal.pone.0089953.g004

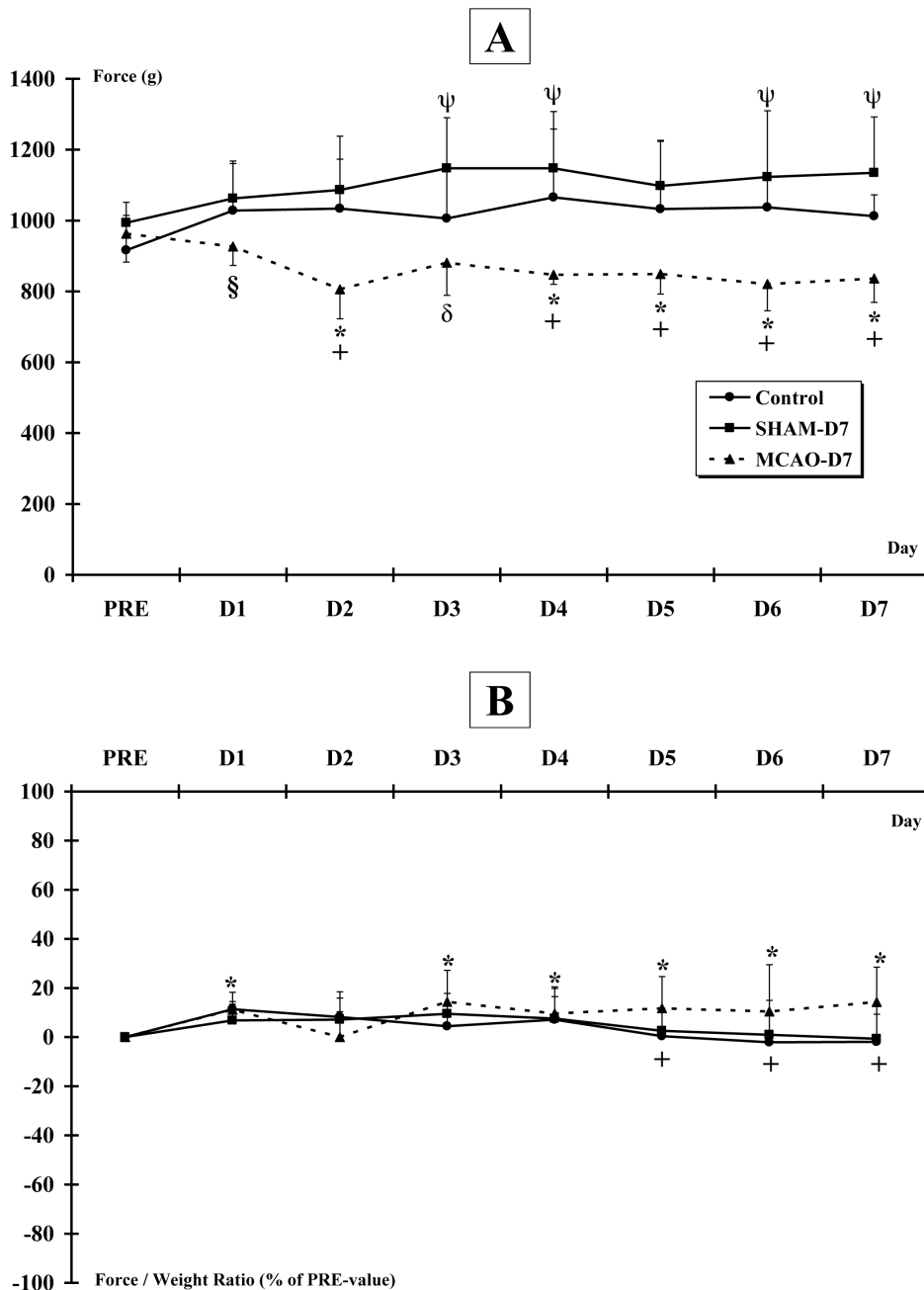
( $458 \pm 20$  g;  $p < 0.01$ ), D2 ( $451 \pm 51$  g;  $p < 0.05$ ), D3 ( $442 \pm 40$  g;  $p < 0.05$ ) and D5 ( $436 \pm 80$  g;  $p < 0.05$ ), no difference was observed from D1 to D6 compared to PRE in MCAO-D7 group. However, the forceR/Weight ratio was significantly increased from D1 to D5 in MCAO-D7 group compared to PRE ( $p < 0.01$  for both) (*data not shown*). The force was significantly lower in MCAO-D7 group compared to Control at D7 ( $p < 0.01$ ) and to SHAM-D7 group at

D6 and D7 ( $p < 0.01$ ). However, the forceR/Weight ratio in the MCAO-D7 group was significantly higher than the Control and SHAM-D7 groups from D2 to D7 (for D4 and D7,  $p < 0.05$ ; for D6,  $p < 0.01$ ; for D2, D3 and D5,  $p < 0.01$ ). At D1, the forceR/Weight ratio in the MCAO-D7 group was significantly higher than the Control group ( $p < 0.05$ ) (*data not shown*).



**Figure 5. The ladder-climbing test.** The ladder-climbing test is used to evaluate the sensorimotor capacities to correctly grip the rung while rats climbed up a inclined ladder. \* indicates a decrease of the successful score in the MCAO-D7 group between PRE and D1 to D7 ( $p < 0.001$ ). The successful score is expressed in % in the graph. + indicates a decrease of the successful score in the MCAO-D7 group compared to Control and SHAM-D7 groups from D1 to D7 ( $p < 0.001$ ). For the MCAO-D7 group:  $\delta$  indicates a significant difference between D7 and D1 to D5;  $\S$  indicates a significant difference between D6 and D1 to D5;  $\psi$  indicates a significant difference between D5 and D1 to D4 ( $p < 0.001$ ). doi:10.1371/journal.pone.0089953.g005



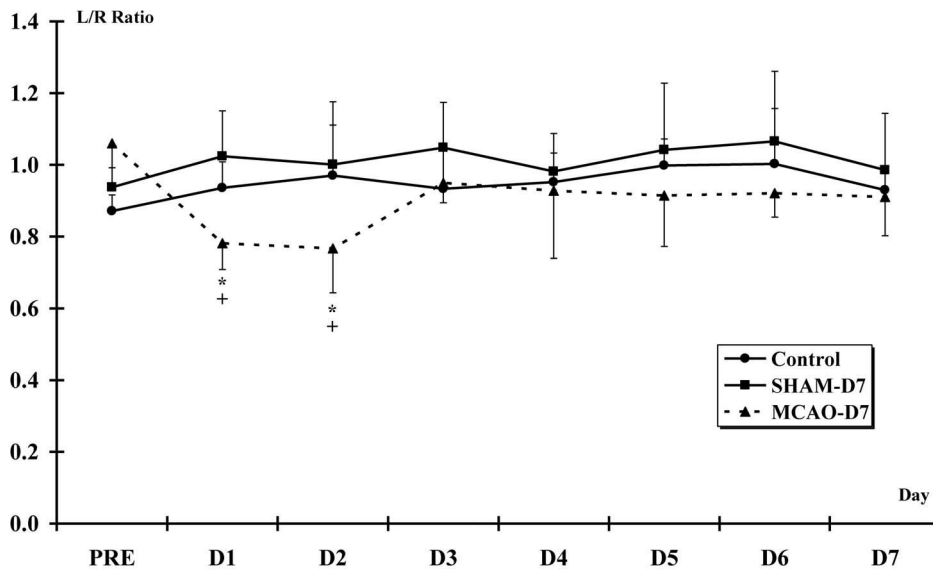


**Figure 6. Grip force exerted by both forepaws.** The grip force is measured by using a grip force tester. **A.** Absolute grip force (g). \* indicates a decrease of force for the MCAO-D7 group between PRE and D2, D4, D5, D6, D7. § indicates a decrease of force between D1 and D2 for the MCAO-D7 group. + indicates a significant difference between MCAO-D7 group and Control and SHAM-D7 groups ( $p < 0.01$ ).  $\delta$  indicates a significant difference between MCAO-D7 group and SHAM-D7 group.  $\psi$  indicates an increase of force for the SHAM-D7 group at D3, D4, D6 and D7. **B.** Relative grip force (force/weight ratio, % of PRE-value). \* indicates a decrease of force for the MCAO-D7 group between PRE and D1, D3, D4, D5, D6, D7 ( $p < 0.05$ ). + indicates a significant difference between MCAO-D7 group and Control ( $p < 0.01$  at D5, D6 and  $p < 0.001$  at D7) and between MCAO-D7 and SHAM-D7 groups ( $p < 0.05$  at D5, D6 and  $p < 0.001$  at D7). doi:10.1371/journal.pone.0089953.g006

## 5. Electrophysiology: H-reflex response before and after isometric exercise

The right MCAO-r induced a change in the motor reflex regulation after isometric exercise of the contralateral triceps brachii muscle one day, but not seven days after the cerebral infarction. It was also found that there was an earlier muscle fatigue during exercise after such injury.

**Isometric exercise.** The duration of exercise was decreased after 2-hour MCAO-r from the first day until the end of the protocol. The times of isometric exercise to reach -50% of the peak value in MCAO-D1 ( $68 \pm 22$  s) and MCAO-D7 ( $73 \pm 16$  s) groups were significantly shorter ( $p < 0.01$ ) than SHAM-D1 ( $171 \pm 73$  s), SHAM-D7 ( $141 \pm 43$  s) and Control ( $146 \pm 54$  s) groups. No difference was observed between SHAM-D1, SHAM-D7 and Control (**Figure 8**).



**Figure 7. Grip force exerted by each forepaw - the L/R ratio.** \* indicates a decrease of L/R ratio for the MCAO-D7 group between PRE and D1-D2. + indicates a significant difference for the MCAO-D7 group and the Control and SHAM-D7 groups ( $p < 0.01$ ). doi:10.1371/journal.pone.0089953.g007

**H-reflex before and after isometric exercise.** The measured H-reflex in resting condition was not modified after ischemia. However, the H-reflex response to isometric exercise was altered one day after lesion and was recovered 7 days after the lesion. Indeed, the  $H_{max}/M_{max}$  ratio after isometric exercise decreased significantly in Control ( $-40 \pm 27\%$ ), SHAM-D1 ( $-44 \pm 28\%$ ), SHAM-D7 ( $-42 \pm 23\%$ ) and MCAO-D7 ( $-42 \pm 24\%$ ) compared to the  $H_{max}/M_{max}$  before exercise ( $p < 0.01$  for all groups), but not for the MCAO-D1 group in which the  $H_{max}/M_{max}$  ratio did not significantly differ after exercise ( $-5 \pm 29\%$ ) (Figure 9). No difference was observed in the  $H_{max}/M_{max}$  ratio between groups before and after exercise.

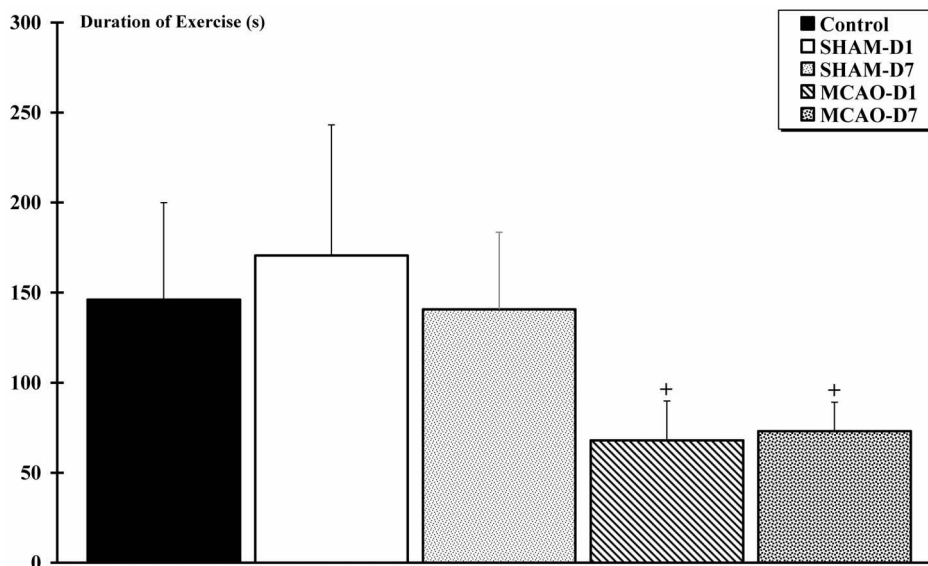
**6. Histology: Cresyl violet staining**

The infarction size for the MCAO-D1 group was spread over half of the right hemisphere (Figure 10.A). The lesion size tended to be slightly decreased in the MCAO-D7 group compared to the MCAO-D1 group (Figure 11). However, no lesion appeared in the SHAM (Figure 10.B) and Control animals.

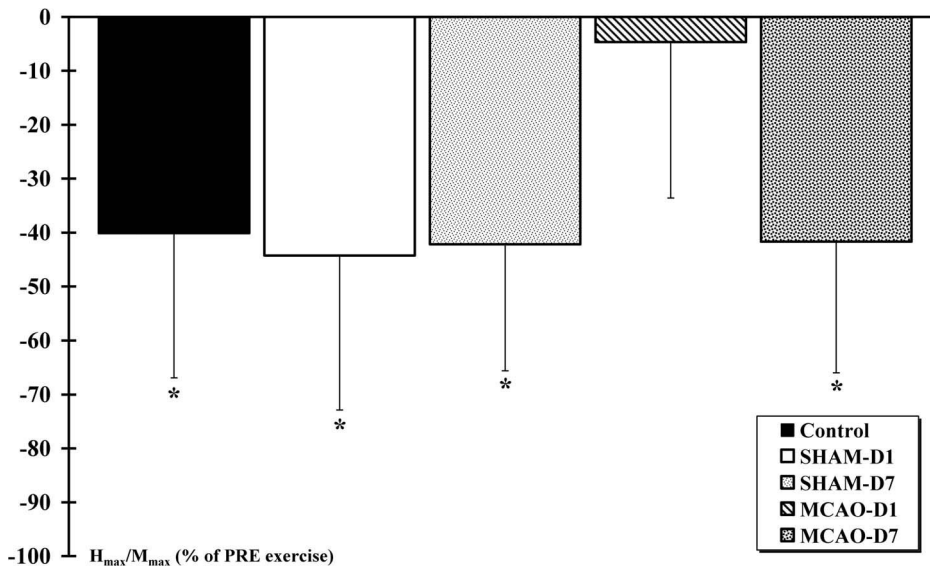
**Figure 10. Representative coronal slices with Cresyl violet following MCAO-r.** A. Slices recorded at MCAO-D1. B. Slices recorded at SHAM-D1.

**7. MRI: Size of cerebral edema**

MRI analysis showed no edema and no cerebral hemorrhages in Control and SHAM groups. Concerning the 2 MCAO animals,



**Figure 8. Duration of isometric exercise evoked by electrical stimulation of the musculospiral nerve.** + indicates a significant difference between MCAO-D1 and MCAO-D7 groups compared to Control, SHAM-D1 and SHAM-D7 groups ( $p < 0.01$ ). doi:10.1371/journal.pone.0089953.g008

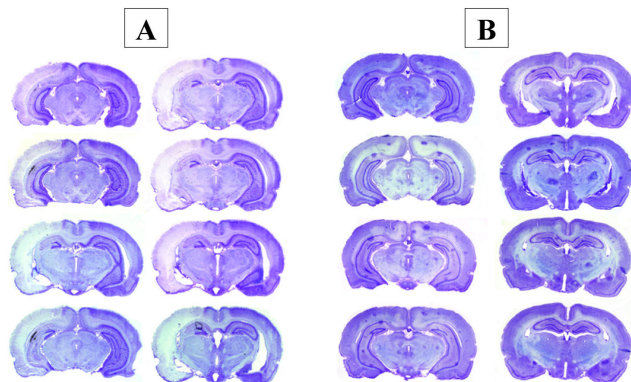


**Figure 9. H<sub>max</sub>/M<sub>max</sub> ratios after isometric exercise.** The M- and H-waves are evoked by stimulation of the musculospiral nerve. \* indicates a significant decrease of H<sub>max</sub>/M<sub>max</sub> evoked after exercise compared to the H<sub>max</sub>/M<sub>max</sub> evoked before exercise for the Control, SHAM-D1, SHAM-D7 and MCAO-D7 groups (p<0.01). No difference was observed for the MCAO-D1 group. doi:10.1371/journal.pone.0089953.g009

cerebral edema was observed at the right hemisphere without affecting the left one from T<sub>2</sub> weighting (**Figure 12 A/B**). For the first rat, edema covered 51% of the right hemisphere and 27% of total brain at D1. The edema volume showed a 29% decline at D7 when compared to the right hemisphere volume, and, a 30% decline when compared to the total brain volume. For the second rat, the edema volume was similar to the first rat at D1 and D7 (**Table 2**). Moreover, no cerebral hemorrhage was observed for these rats from T<sub>2</sub>\* slices (**Figure 12 C/D**). No sign of lesion appeared in the SHAM and Control animals.

**Discussion**

The main results of the present study indicated that the right MCAO-r induced a change in the motor reflex regulation after isometric exercise of the contralateral *triceps brachii* muscle. The rats that underwent a 2-hour cerebral ischemia displayed an earlier muscle fatigue during isometric exercise throughout the protocol.



**Figure 10. Representative coronal slices with Cresyl violet following MCAO-r.** A. Slices recorded at MCAO-D1. B. Slices recorded at SHAM-D1. doi:10.1371/journal.pone.0089953.g010

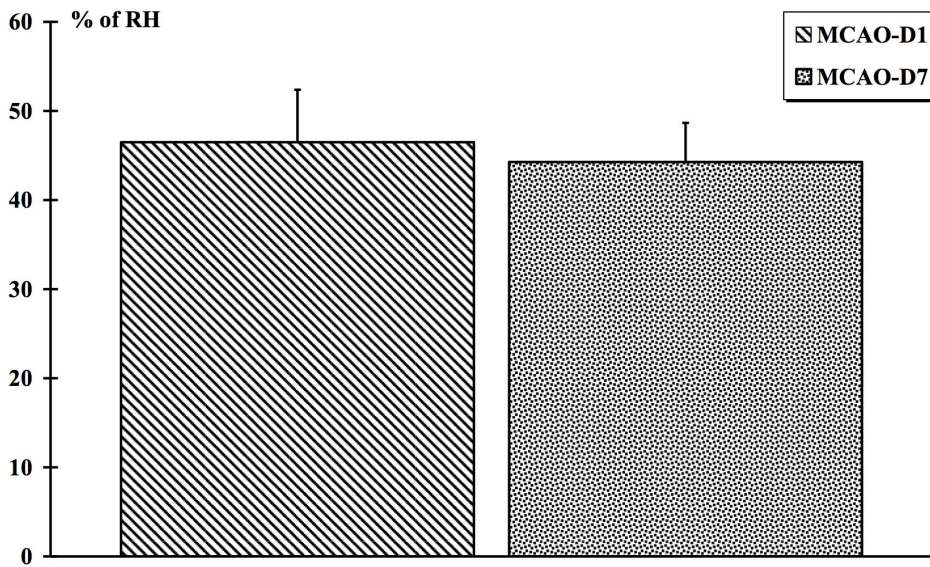
In addition, we deepened the functional deficits level induced by cerebral ischemia through the analysis of behavioral tests assessing force production, static balance and sensorimotor alterations.

**1. Methodological considerations**

The similar results obtained in Control and SHAM groups confirmed that the MCAO-r surgery without cerebral ischemia did not influence the recorded neuromuscular parameters. Furthermore, the results of different behavioral tests for Control and SHAM groups were not modified throughout the protocol meaning that these measurements were reliable during one week. However, the increased grip force of both forelimbs in the SHAM group during the first week post-surgery could be associated with stress often present after surgical procedure [44]. Nevertheless, this result stayed opposed to the one observed in cerebral lesioned animals. The observed functional deficits could thus be related with the MCAO-r effects in our study.

Looking at the infarct volume (Cresyl violet staining), the MCAO-r reliably affected the right hemisphere and thus induced a reproducible lesion. In addition, the histological analysis by Cresyl violet staining indicated that the infarct volume showed a tendency to decrease between D1 and D7 confirming previous studies [28,31,45]. Although MRI was performed on few rats, cerebral edema clearly showed an increase one day after MCAO-r and decreased at the 7<sup>th</sup> day that was in accordance with previous studies [25,27]. The infarct volume could be explained by the fact that the edema exacerbated the lesion size. Being maximal at one day post-ischemia, the edema accentuated the lesion size while decreasing it at the end of the first week. We could suggest that the spinal sensorimotor adaptation was assessed on animals with a similar cerebral lesion in our study.

Several methodological criteria were respected to evoke *triceps brachii* H-reflex and ensured that the recording conditions of H-reflex were similar for each animal in our study: 1) H-wave progressively increased from the first deflection to the maximal H-wave amplitude when the stimulation intensity was incremented, as previously described [46], 2) the stimulation intensity to elicit H<sub>max</sub> was higher than or equal to the stimulation intensity



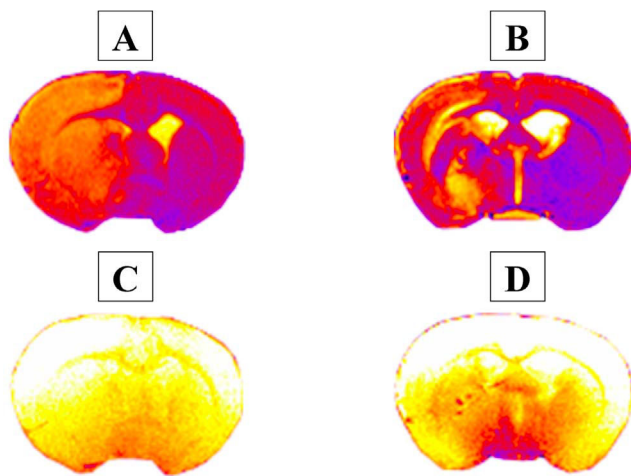
**Figure 11. Infarct volume measurement from the Cresyl violet staining.** The cerebral lesion size observed in the right hemisphere (RH) after MCAO-r was measured at D1 and D7. Values are expressed in % of the RH. doi:10.1371/journal.pone.0089953.g011

necessary to elicit  $M_{max}$  [47], 3) H-reflex was not abolished when electrical stimulation was applied at  $M_{max}$  intensity, 4) M-wave amplitude was always higher than H-wave regardless of the stimulation intensity and 5) the latency between M- and H-waves was similar during the different recordings for each animal. It seems important to notice that the location of recording intramuscular electrodes was not modified during the experiments to ensure a reliable comparison between the PRE- and POST-exercise recordings. Moreover, the  $H_{max}/M_{max}$  ratio limited the influence of muscle membrane excitability that could change the interpretation of H-reflex results [40].

**2. The motor reflex response to exercise is disturbed after MCAO-r**

The H-reflex, obtained before exercise, was not modified by cerebral ischemia. This result was in agreement with a previous study on humans in which no difference of the *extensor carpi radialis longus* and *flexor carpi radialis* H-reflex in resting condition was detected after stroke injury [19]. Other study showed an opposite result by measuring an increase in H-reflex after stroke injury [18]. Such controversial observation between these two studies may be explained by different methodological approach for measuring H-reflex ( $H_{max}$  amplitude vs.  $H_{slope}/M_{slope}$  and  $H_{max}/M_{max}$ ). It suggests that the synaptic transmission between large diameter afferent fibers (group I and II) and  $\alpha$ -motoneurons seems not to be altered following MCAO-r.

However, the H-reflex response to exercise was changed one day after lesion. Indeed, contrary to the H-reflex response of the reference groups (Control and SHAM) that strongly decreased after isometric exercise, the motor reflex response of the injured rats remained stable after exhaustive exercise. To explain this result, we suggested that the neural network activated during exercise and regulating the H-reflex response in the spinal cord might be modified after MCAO-r. Indeed, the regulation of the H-reflex amplitude is associated with the activity of motor descending pathways and with the afferents of the active muscle. It was also



**Figure 12. MRI following MCAO-r on 2 rats.** Representative coronal slices obtain with  $T_2$ -weighting: **A.** at D1 **B.** at D7 post-ischemia. Representative coronal slices obtain with  $T_2^*$  weighting: **C.** at D1, **D.** at D7 post-ischemia. doi:10.1371/journal.pone.0089953.g012

**Table 2. MRI analysis ( $T_2$ ).**

	Rat 1		Rat 2	
	D1	D7	D1	D7
<b>Edema Volume (<math>mm^3</math>)</b>	447	284	450	302
<b>Right Hemisphere Volume (<math>mm^3</math>)</b>	868	789	871	792
<b>Brain Volume (<math>mm^3</math>)</b>	1689	1565	1656	1554

Size of the cerebral edema at the right hemisphere after MCAO-r on 2 rats. The measures are realized at D1 and D7. doi:10.1371/journal.pone.0089953.t002

found that the afferents from antagonist and/or synergic muscles and cutaneous/articular afferents could change the H-reflex amplitude [22]. In our study, the nerves of the synergic and antagonist muscles of the *triceps brachii* were sectioned to avoid the influence of their afferent fibers during H-reflex recordings. Consequently, the mechanisms involving the surrounding muscles of the *triceps brachii* did not contribute to adjust the motor reflex activity after the isometric exercise.

Given that the isometric exercise was exhaustive, the active muscle may accumulate metabolite known to activate the muscle afferents from groups I, II (mechanosensitive), III and IV (mechano- and metabosensitive) [23,48]. In addition, cerebral damages may disturb descending pathways regulating motor response at the spinal reflex [3]. Consequently, the H-reflex response to exercise might be associated with changes of descending pathway activity on *triceps brachii* motoneurons and/or changes of the *triceps brachii* muscle afferent activity. Neural mechanisms underlying H reflex response to exercise remains to determine in further studies.

### 3. The H-reflex response to exercise seemed to recover at the end of the first week post-cerebral ischemia

The H-reflex response to isometric exercise was normalized as soon as the first week post-MCAO-r. Indeed, the  $H_{\max}/M_{\max}$  ratio decreased after exercise one-week post-MCAO-r as in the reference groups. It means that the mechanisms underlying the motor reflex regulation evolved during the first week post-ischemia. The interpretation of such result needs caution because we could not affirm that the regulation of motor reflex returned to the same pre-injury state. The decrease of H-reflex after exercise could be associated with other neural mechanisms compared to control animals resulting in a similar H-reflex profile. Further studies are needed to clarify such neural strategy.

### 4. MCAO-r induced more important muscle fatigue from the first day

Our results confirmed that a disturbed motor control was associated with greater muscle fatigability after focal cerebral ischemia [49]. The well-known muscle atrophy and myotypology changes could not be responsible of such result the one-day after occlusion [50]. However, the observed fatigue could be partially explained by the modification of motor reflex activity affecting the motoneuronal recruitment. Indeed, it was demonstrated that force decline induced by exhaustive exercise could, to a certain degree, be explained by modification of the motor reflex response [51,52]. Nevertheless, several authors demonstrated that one week after 1-hour cerebral ischemia induced a loss of muscle mass that affected both type II and type I muscle fibers [50]. The isometric exercise-induced fatigue, observed 7 days after MCAO-r, may be related to muscle atrophy and/or myotypology changes.

### 5. Functional deficits were maintained during the acute phase after MCAO-r

The elevated body swing test results indicated for the first time that 2-hour cerebral ischemia induced a strong motor asymmetry without any signs of recovery. Previous studies shown that a 1-hour cerebral occlusion induced a preferential and stable left orientation in 85% of trials (from 1 day to 2 months post MCAO-r) [36,53]. After a 30 min focal ischemia, the orientation of swing stayed on the left side but could be inferior to 75% of trials [54]. Therefore, our study suggests that the duration of MCAO influences the severity of motor asymmetry.

In our study, the recovery of the ability to climb and grip the ladder stayed incomplete at the end of the protocol. It was in accordance to a previous study that demonstrated an increase in foot fault (53.4%) following a 2-hour occlusion [10]. Several reasons might explain this result such as a deficit in propulsion, inter-limb coordination and an alteration of proprioception of the left forelimb muscles [38]. However, the respective contribution of these different mechanisms stayed difficult to quantify and should thus be further clarified.

Animals were not able to maintain balance on the wooden beams during the first 2 days following the MCAO-r suggesting vestibulomotor deficits. Moreover, we observed that rats were systematically oriented on the left side inducing an important loss of balance. Therefore, the motor asymmetry may contribute to affect static balance on beams. Our results allowed us to observe a progressive (incomplete) recovery of balance in static position from the 4<sup>th</sup> day post-ischemia. Several studies considered that the beam balance test was not sensitive enough to detect changes in balance after cerebral ischemia [10,37]. However, we performed a simple methodological modification for this test. We left a 5 cm space between the 2 wooden beams in order to force rats only to use their paws and not their belly that could strongly disturb balance results. Our methodological modification of the beam balance test may be considered in further studies to optimize the assessment of functional disorders.

A loss of force exerted by both forelimbs has already been observed in few studies after MCAO-r, but some controversial results remain [14,55,56]. Therefore, the force measurement was deepened in the present study. Our results indicated that the loss of weight resulting from MCAO-r seemed to play an important role for the force production. Indeed, we observed that the force exerted by both forelimbs showed an opposite pattern that is an increase when the force was normalized to the rat weight. Thus, we suggest that the weight should be systematically taken into account for force measurements.

Interestingly, the force exerted by the left forelimb showed opposite response to the one produced by the right forelimb. The force of the left forelimb showed a light decrease when the weight of the animal was taken into account. The absence of a substantial loss of force (contrary to human outcomes) may be explained by the fact that the MCAO-r did not directly affect the motor cortex area, but mainly disturbed cerebral structures, such as the striatum or the thalamus, involved in the regulation of motor activity [11,57]. In parallel, the force produced by the right forelimb (normalized by the weight) significantly increased during protocol. The compensation observed at the right forelimb level might represent a major force adaptation following transient focal cerebral ischemia in rats. The motor asymmetry, revealed this time by the L/R ratio, only lasted a couple of days and may be linked to the short-lasting decrement of left forelimb force.

In addition, it is noteworthy to add that the animals showed difficulties to grip the bar with the left forepaw when using it separately to the right paw. However, such difficulties were not observed when animals used both left and right forepaws. It might mean that the sum of the force exerted separately by each forelimb partially reflected the force produced by forelimbs together. It could be suggested with caution that the increment of force exerted by both forelimbs (when normalized by the weight) was associated with the increase of the right forelimb force.

## Conclusion and Clinical Perspectives

To the best of our knowledge, the present study was the first to show an alteration of the motor reflex regulation following

MCAO-r. The neuromuscular adaptations in the acute and chronic phases should be more investigated, as they are essential to understand the neural modulations following severe cerebral ischemia [3]. Consequently, the assessment of treatments should be optimized and more complete. Our study also indicated that the MCAO-r method allowed clarifying the neuromuscular adaptations in the acute phase.

In addition, this study confirmed that the use of the physical exercise as a diagnostic tool could reveal neuromuscular changes that cannot be found in resting condition. Indeed, the alteration of the motor reflex regulation could not be detected without the use of the isometric exercise during electrophysiological recordings.

## References

- Braeuninger S, Kleinschnitz C (2009) Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Exp Transl Stroke Med* 1: 8.
- Broussalis E, Trinka E, Killer M, Harrer A, McCoy M, et al. (2012) Current therapies in ischemic stroke. Part B. Future candidates in stroke therapy and experimental studies. *Drug Discov Today* 17: 671–684.
- Ward NS (2005) Mechanisms underlying recovery of motor function after stroke. *Postgrad Med J* 81: 510–514.
- Carmichael ST (2005) Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx* 2: 396–409.
- DeVries AC, Nelson RJ, Traustman RJ, Hurn PD (2001) Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research: will it prove useful? *Neurosci Biobehav Rev* 25: 325–342.
- Gupta YK, Briyal S (2004) Animal models of cerebral ischemia for evaluation of drugs. *Indian J Physiol Pharmacol* 48: 379–394.
- Gutknecht J, Larrey D, Ychou M, Fedkovic Y, Janbon C (1991) [Severe ischemic hepatitis after taking cibenzoline]. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)* 27: 269–270.
- Kawamata T, Alexis NE, Dietrich WD, Finklestein SP (1996) Intracisternal basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances behavioral recovery following focal cerebral infarction in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 542–547.
- Yamaguchi T, Suzuki M, Yamamoto M (1995) YM796, a novel muscarinic agonist, improves the impairment of learning behavior in a rat model of chronic focal cerebral ischemia. *Brain Res* 669: 107–114.
- Aronowski J, Samways E, Strong R, Rhoades HM, Grotta JC (1996) An alternative method for the quantitation of neuronal damage after experimental middle cerebral artery occlusion in rats: analysis of behavioral deficit. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 705–713.
- Kleim JA, Boychuk JA, Adkins DL (2007) Rat models of upper extremity impairment in stroke. *ILAR J* 48: 374–384.
- Roof RL, Schielke GP, Ren X, Hall ED (2001) A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke* 32: 2648–2657.
- Akhtar M, Pillai K, Vohora D (2008) Effect of thioperamide on oxidative stress markers in middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia in rats. *Hum Exp Toxicol* 27: 761–767.
- Erdo F, Berezsenyi P, Nemet L, Andras F (2006) Talampanel improves the functional deficit after transient focal cerebral ischemia in rats. A 30-day follow up study. *Brain Res Bull* 68: 269–276.
- Krakauer JW (2005) Arm function after stroke: from physiology to recovery. *Semin Neurol* 25: 384–395.
- Forrester LW, Hanley DF, Macko RF (2006) Effects of treadmill exercise on transcranial magnetic stimulation-induced excitability to quadriceps after stroke. *Arch Phys Med Rehabil* 87: 229–234.
- Hwang IS, Lin CF, Tung LC, Wang CH (2004) Responsiveness of the H reflex to loading and posture in patients following stroke. *J Electromyogr Kinesiol* 14: 653–659.
- Phadke CP, Robertson CT, Condliffe EG, Patten C (2012) Upper-extremity H-reflex measurement post-stroke: reliability and inter-limb differences. *Clin Neurophysiol* 123: 1606–1615.
- Stowe AM, Hughes-Zahner L, Barnes VK, Herbelin LL, Schindler-Ivens SM, et al. (2013) A pilot study to measure upper extremity H-reflexes following neuromuscular electrical stimulation therapy after stroke. *Neurosci Lett* 535: 1–6.
- Zehr EP (2006) Training-induced adaptive plasticity in human somatosensory reflex pathways. *J Appl Physiol* (1985) 101: 1783–1794.
- Misiaszek JE, Pearson KG (1997) Stretch of quadriceps inhibits the soleus H reflex during locomotion in decerebrate cats. *J Neurophysiol* 78: 2975–2984.
- Knikou M (2008) The H-reflex as a probe: pathways and pitfalls. *J Neurosci Methods* 171: 1–12.
- Adreani CM, Hill JM, Kaufman MP (1997) Responses of group III and IV muscle afferents to dynamic exercise. *J Appl Physiol* (1985) 82: 1811–1817.
- Liu F, Schafer DP, McCullough LD (2009) TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods* 179: 1–8.
- Lin TN, He YY, Wu G, Khan M, Hsu CY (1993) Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke* 24: 117–121.
- Yang YR, Wang RY, Wang PS (2003) Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats. *Neurosci Lett* 339: 91–94.
- Virley D, Beech JS, Smart SC, Williams SC, Hodges H, et al. (2000) A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behavior. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 563–582.
- Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y (2011) The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol (Oxf)* 201: 275–287.
- Carmichael ST (2003) Plasticity of cortical projections after stroke. *Neuroscientist* 9: 64–75.
- Stroemer RP, Kent TA, Hulsebosch CE (1995) Neocortical neural sprouting, synaptogenesis, and behavioral recovery after neocortical infarction in rats. *Stroke* 26: 2135–2144.
- Lee SU, Kim DY, Park SH, Choi DH, Park HW, et al. (2009) Mild to moderate early exercise promotes recovery from cerebral ischemia in rats. *Can J Neurol Sci* 36: 443–449.
- Yang YR, Chang HC, Wang PS, Wang RY (2012) Motor performance improved by exercises in cerebral ischemic rats. *J Mot Behav* 44: 97–103.
- Wang-Fischer Y (2008) *Manual of Stroke Models in Rats*. Boca Raton: CRC Press. 352 p.
- Uluc K, Miranpuri A, Kujoth GC, Akture E, Baskaya MK (2011) Focal cerebral ischemia model by endovascular suture occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Vis Exp*.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20: 84–91.
- Borlongan CV, Cahill DW, Sanberg PR (1995) Locomotor and passive avoidance deficits following occlusion of the middle cerebral artery. *Physiol Behav* 58: 909–917.
- Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen H, Schmid-Elsaesser R (2000) Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res* 863: 94–105.
- Metz GA, Whishaw IQ (2009) The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. *J Vis Exp*.
- Crone C, Nielsen J (1989) Methodological implications of the post activation depression of the soleus H-reflex in man. *Exp Brain Res* 78: 28–32.
- Zehr EP (2002) Considerations for use of the Hoffmann reflex in exercise studies. *Eur J Appl Physiol* 86: 455–468.
- Felix MS, Popa N, Djelloul M, Boucraut J, Gauthier P, et al. (2012) Alteration of forebrain neurogenesis after cervical spinal cord injury in the adult rat. *Front Neurosci* 6: 45.
- Tureyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Dempsey RJ (2004) Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. *J Neurosci Methods* 139: 203–207.
- Kober F, Duhamel G, Cozzone PJ (2008) Experimental comparison of four FAIR arterial spin labeling techniques for quantification of mouse cerebral blood flow at 4.7 T. *NMR Biomed* 21: 781–792.
- Desborough JP (2000) The stress response to trauma and surgery. *Br J Anaesth* 85: 109–117.
- Yang YR, Wang RY, Wang PS, Yu SM (2003) Treadmill training effects on neurological outcome after middle cerebral artery occlusion in rats. *Can J Neurol Sci* 30: 252–258.
- Cliffer KD, Tonra JR, Carson SR, Radley HE, Cavnor C, et al. (1998) Consistent repeated M- and H-Wave recording in the hind limb of rats. *Muscle Nerve* 21: 1405–1413.
- Gozariu M, Roth V, Keime F, Le Bars D, Willer JC (1998) An electrophysiological investigation into the monosynaptic H-reflex in the rat. *Brain Res* 782: 343–347.
- Gandevia SC (2001) Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev* 81: 1725–1789.

The exercise as a model should be more taken into account in further studies.

## Acknowledgments

We are grateful to Alain DONNEAUD for his help in technical support.

## Author Contributions

Performed the experiments: CPB JL MSF VP FK PD TM. Analyzed the data: CPB JL MSF VP JB. Contributed reagents/materials/analysis tools: FK VM FMB JJT. Wrote the paper: JL CPB VP PD.

49. Dobkin BH (2004) Strategies for stroke rehabilitation. *Lancet Neurol* 3: 528–536.
50. Chang HC, Yang YR, Wang PS, Kuo CH, Wang RY (2010) Effects of insulin-like growth factor 1 on muscle atrophy and motor function in rats with brain ischemia. *Chin J Physiol* 53: 337–348.
51. Duchateau J, Balestra C, Carpentier A, Hainaut K (2002) Reflex regulation during sustained and intermittent submaximal contractions in humans. *J Physiol* 541: 959–967.
52. Garland SJ (1991) Role of small diameter afferents in reflex inhibition during human muscle fatigue. *J Physiol* 435: 547–558.
53. Borlongan CV, Tajima Y, Trojanowski JQ, Lee VM, Sanberg PR (1998) Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Exp Neurol* 149: 310–321.
54. Chen JR, Cheng GY, Sheu CC, Tseng GF, Wang TJ, et al. (2008) Transplanted bone marrow stromal cells migrate, differentiate and improve motor function in rats with experimentally induced cerebral stroke. *J Anat* 213: 249–258.
55. Deshmukh A, Patel J, Prajapati A, Vaghela M, Goswami H (2011) Cerebroprotective effects of extract of *Beta vulgaris* (C.) in middle cerebral artery occlusion (MCAO)-induced cerebral ischemia. *Phytopharmacology* 1: 138–147.
56. Ishrat T, Sayeed I, Atif F, Stein DG (2009) Effects of progesterone administration on infarct volume and functional deficits following permanent focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1257: 94–101.
57. Gharbawie OA, Whishaw IQ (2006) Parallel stages of learning and recovery of skilled reaching after motor cortex stroke: “oppositions” organize normal and compensatory movements. *Behav Brain Res* 175: 249–262.

## Review Article

# Physical Exercise as a Diagnostic, Rehabilitation, and Preventive Tool: Influence on Neuroplasticity and Motor Recovery after Stroke

Caroline Pin-Barre<sup>1,2</sup> and Jérôme Laurin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aix Marseille Université, CNRS, ISM UMR 7287, 13288 Marseille, France

<sup>2</sup>Université de Nice Sophia-Antipolis et Université de Sud Toulon-Var, LAMHES, UPRES EA 6309, 06204 Nice, France

Correspondence should be addressed to Jérôme Laurin; [jerome.laurin@univ-amu.fr](mailto:jerome.laurin@univ-amu.fr)

Received 30 January 2015; Revised 3 June 2015; Accepted 18 June 2015

Academic Editor: Brandon A. Miller

Copyright © 2015 C. Pin-Barre and J. Laurin. 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.

Stroke remains a leading cause of adult motor disabilities in the world and accounts for the greatest number of hospitalizations for neurological disease. Stroke treatments/therapies need to promote neuroplasticity to improve motor function. Physical exercise is considered as a major candidate for ultimately promoting neural plasticity and could be used for different purposes in human and animal experiments. First, acute exercise could be used as a diagnostic tool to understand new neural mechanisms underlying stroke pathophysiology. Indeed, better knowledge of stroke mechanisms that affect movements is crucial for enhancing treatment/rehabilitation effectiveness. Secondly, it is well established that physical exercise training is advised as an effective rehabilitation tool. Indeed, it reduces inflammatory processes and apoptotic marker expression, promotes brain angiogenesis and expression of some growth factors, and improves the activation of affected muscles during exercise. Nevertheless, exercise training might also aggravate sensorimotor deficits and brain injury depending on the chosen exercise parameters. For the last few years, physical training has been combined with pharmacological treatments to accentuate and/or accelerate beneficial neural and motor effects. Finally, physical exercise might also be considered as a major nonpharmacological preventive strategy that provides neuroprotective effects reducing adverse effects of brain ischemia. Therefore, prestroke regular physical activity may also decrease the motor outcome severity of stroke.

## 1. Introduction

Despite progress in functional rehabilitation, stroke patients frequently present chronic motor disabilities [1]. Therefore, it seems crucial that both scientists and therapists continue to investigate stroke pathophysiology and improve the effectiveness of physical training programs on motor recovery. In recent years, physical exercise was used in stroke experiments for 3 main purposes, namely, the detection of physical dysfunctions, the improvement of motor activity, and the prevention of severe damage. Such contributions might ultimately improve both physical independence and quality of life, while reducing cardiovascular complications and recurrent stroke [2, 3].

First, acute fatiguing exercise is used in preclinical experiments as a diagnostic tool to detect sensorimotor dysfunctions and/or reveal treatment effectiveness that cannot be observed in resting condition. Indeed, alteration of motor unit activation in both affected and unaffected sides or changes of the motor reflex regulation were highlighted during/after acute exercise [4, 5]. Moreover, a higher corticospinal tract activity was found only after acute treadmill exercise in trained patients contrary to untrained patients [6].

Then, added to its beneficial effects on cardiorespiratory fitness and muscular endurance, chronic physical activity is effective as a rehabilitation tool for improving functional recovery and promoting neural plasticity [3, 7]. Indeed, it



was recently found that physical training promoted cerebral angiogenesis, vasomotor reactivity, and neurotrophic factor release but also reduced apoptosis processes, excitotoxicity, and inflammation into the peri-infarct site and could improve the regulation of motor unit activation [8–12].

Nevertheless, physical training seems to remain insufficient to completely restore neural and motor functions. A recent approach for stroke therapy is to combine physical training with pharmacological treatments, known to accentuate and/or accelerate neuroplasticity. In the present review, we discuss the influence of physical training with or without additional pharmacological treatment on neuroplasticity and motor recovery after stroke.

Although regular exercise reduces the risk of developing stroke [13], it may occur for physically active individuals [14, 15]. However, endogenous neuroprotective effects induced by prestroke physical activity may exhibit beneficial influence on recovery by reducing both brain damage and motor outcome severity [16–19].

The present review is designed to discuss the multiple uses of physical exercise to improve neural and motor recovery following cerebral ischemia/stroke from both animal and human studies. We suggested that exercise-induced neural plasticity is crucial to better understanding motor outcomes after stroke and improving rehabilitation program effectiveness.

## 2. Acute Exercise-Induced Neural Adjustments after Stroke

Animal and human studies reported that acute exercise could reveal changes in muscle activation regulation after cerebral ischemia. More precisely, the electromyographic (EMG) activity was lower in affected hindlimb muscles during a single bout of treadmill exercise compared to unaffected muscles, reflecting a strong decrease of the motoneuronal recruitment from spinal and/or supraspinal motor pathways [4, 20]. A reduced corticospinal excitability to the paretic quadriceps was also observed by showing strong decrease of the motor evoked potential (MEP) amplitude during a running exercise [4]. In addition, cortical activation increased in the unaffected side while it decreased in the affected side after ankle dorsiflexion movements that suggested compensatory neural mechanisms [21–26].

Spinal motor reflex plasticity also seems to contribute to motor disorders after stroke but the underlying neural mechanisms remain poorly understood [36, 37]. A recent study has demonstrated that the motor reflex regulation (H reflex) was acutely altered following an exhaustive isometric exercise on affected triceps brachii in MCAO rats whereas resting H reflex did not differ between injured and noninjured animals [5]. It was postulated that such findings might be partially due to an alteration of motor reflex regulation by muscle afferents that remained activated after intense exercise (groups III and IV muscle afferents).

Fatigue process alterations could also be observed during dynamic exercise after cerebral ischemia by using EMG recording. When fatigue progresses, there is a shift to lower motor unit frequencies. Median power frequency (MPF),

which is the sum of product of the EMG power spectrum and the frequency divided by the total sum of the power spectrum, is frequently used for the assessment of muscle fatigue in surface EMG signals [38]. Therefore, a decrease in MPF serves as an index of fatigue [39]. After cerebral ischemia, the observed MPF drop at the unaffected hindlimb reflected a higher muscle fatigue compared to the affected one (no MPF decrement). A lesser fatigue-related decrease in median frequency was also observed in humans at the paretic side compared to the nonparetic side during both voluntary contractions and locomotor activity [20, 40]. This accelerated fatigue process of the unaffected hindlimb was usually explained by its higher weight bearing that compensated for the affected side. Nevertheless, reduction of work without MPF decrease of affected muscle was reported during repeated eccentric-concentric actions suggesting that peripheral fatigue through excitation-contraction coupling disruption might contribute to exercise intolerance and neuromuscular disorders of stroke patients [41].

It was also found that acute exercise-induced neural adjustments could reveal the effectiveness of a given treatment. Indeed, Forrester and colleagues have first compared trained and untrained stroke patients on the observed neural response to a single bout of treadmill exercise [6]. They found that the MEP amplitude increased in trained patients after this exercise contrary to untrained individuals, in which MEP amplitude remained unchanged. Such training corticospinal adaptation was not observed in the preexercise MEP amplitudes, but only after exercise, and provided insight into the effectiveness of 6-month treadmill training [6].

## 3. Effects of Poststroke Physical Training on Neuroplasticity and Motor Recovery

The effects of chronic physical training in stroke patients have received more attention in scientific literature than the ones of acute exercise. Indeed, physical rehabilitation remains the first-line intervention strategy to attenuate chronic impairments of sensorimotor function by promoting brain organization and reducing infarct volume during the first weeks after stroke [42, 43]. Given that the infarct size was not always correlated with motor recovery, it was suggested that other adaptive mechanisms might take part [44, 45]. Numerous recent studies indicated that early treadmill training promotes neuroplasticity by acting on brain vasomotor activity and angiogenesis, neurotrophic factor and apoptosis marker expressions, brain inflammatory processes, blood brain barrier (BBB) integrity, and muscle activation control (Figure 1) [46–48].

Cerebral blood flow in the ischemic region is affected following human stroke and cerebral ischemia in mice due to impaired cerebral vasomotor reactivity [8, 49]. Therefore, restoring an adequate cerebral vasomotor reserve capacity is crucial to supplying required nutriment and O<sub>2</sub>, as well as reducing infarct volume and functional deficits [50, 51]. Preclinical and clinical studies bring strong evidence on endurance training effectiveness to promote vasomotor reactivity (endothelium-dependent vasorelaxation) and angiogenesis in the ischemic penumbra, which contribute to

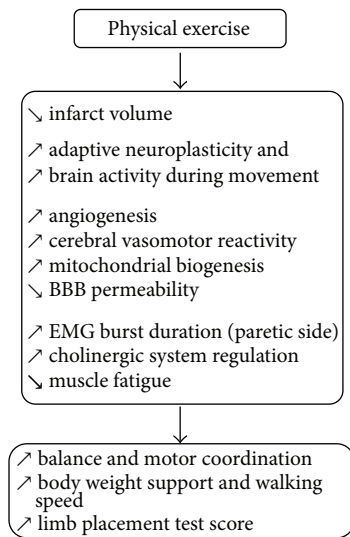


FIGURE 1: Beneficial structural and functional plasticity induced by physical exercise in stroke individuals.

limiting brain damage and motor deficits [9, 50]. Indeed, treadmill training increased the most commonly studied angiogenic growth factor expression, namely, vascular endothelial growth factor (VEGF), and its regulatory protein, caveolin-1, that might contribute to explaining the increase of new vessel growth and vascular density [52–56]. The training effect on angiogenesis was reinforced by evidence showing that 2 weeks of treadmill training increased the angiotensin expression, another angiogenic growth factor that has a key role in new vessel formation [54]. Other findings revealed that the area of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) immunopositive cells (protein involved in angiogenesis and integrin activation) was significantly increased around the infarct after 28 days of treadmill training [46]. Daily treadmill training induced an increase of GFAP expression (proteins playing a role in vascular cerebral plasticity) suggesting that area of neovascularization was higher in exercised animals [47]. Moreover, voluntary running training upregulated by 3- to 4-fold aortic endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA expression and it remained elevated 10 days after training [8, 9]. Such findings concur with the fact that beneficial effect of running was completely abolished in animals lacking eNOS expression and in mice treated with a NOS inhibitor or an antiangiogenic compound such as endostatin [9]. Moreover, training program increased endothelial progenitor cells (EPC) in bone marrow that are known to strongly influence eNOS expression. It is noteworthy to add that only 3 days of aerobic exercise reduced brain microvascular endothelial cell apoptosis related to the increase of shear stress that was followed by modest improvement of cerebral blood flow [51].

Physical training can also upregulate the expression of some neurotrophic factors, such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), nerve growth factor (NGF), and insulin-like growth factor (IGF-1).

BDNF is one of the most active neurotrophins that binds to the tyrosine kinase receptor (trkB). Overall, this association triggers several molecular pathways that promote neural proliferation and survival and synaptic and axonal plasticity by enhancing synapse formation, dendritic growth, and remodeling [57]. Furthermore, BDNF seems also to act on motor function because blocking BDNF mRNA expression by injecting antagonist reduced skilled motor abilities [58].

The neuroprotective effect of endogenous and exogenous BDNF is well established after brain infarction [12, 59–62]. Basal endogenous BDNF/trkB expression increased within both hemispheres following moderate cerebral ischemia (including the penumbra) during the first 2 weeks but motor recovery remains widely insufficient [63–65]. Therefore, treatments that enhance BDNF/trkB production seem relevant to improve motor recovery (even if infarct size is not modified) [11, 66]. It was found that delayed intravenous BDNF administration (20  $\mu\text{g}/\text{day}$ ) for 5 days improved long-term functional outcomes such as running and sensorimotor recovery after ischemia [11, 66, 67].

Interestingly, endurance training stimulated endogenous BDNF/trkB expression and may play a neuroplastic role following cerebral ischemia or intracerebral hemorrhage in rat and mice [58, 63, 68–72]. This enhanced BDNF/trkB was observed in both hemispheres but especially in the nonlesional hemisphere compared to healthy animals under the same program (that might represent a compensatory mechanism) [53, 69]. Despite the fact that there is no direct evidence, the training-related BDNF expression is often associated with motor recovery improvement [58, 63, 70]. It was demonstrated that 7 consecutive training days could be sufficient to increase BDNF expression and improve motor recovery [72–74]. Although endurance exercise upregulates BDNF expression in striatum and cortex, functional outcome improvement might be more related to hippocampal BDNF expression [70, 72]. Indeed, voluntary wheel exercise is known to induce substantial motor recovery associated with the highest hippocampal BDNF level [70]. Another study also found a positive correlation between motor function recovery rate and hippocampal BDNF expression after treadmill training following cerebral infarction [72].

Finally, the number of NGF-immunopositive cells, promoting cell growth and neuronal activity, was particularly increased over a widespread region around the infarct zone in trained rats [46]. NGF expression, which may be the result of heightened neuronal activity during exercise, could contribute to reducing brain damage around 4 weeks after ischemic stroke.

Physical training could reduce ischemic brain damage and motor deficits by other mechanisms such as reduction of acute inflammatory reactions and neuronal apoptosis [75]. Indeed, it was demonstrated that the neurotrophic factor midkine (MK), which could delay the process of neuronal death during the early phase after cerebral infarction, was higher expressed in the cells of the peri-infarct region after physical training program [46].

Cerebral ischemia-induced cell death is commonly attributed to necrosis and apoptosis, but it was recently found

that inappropriate autophagy might also lead to cell death [76]. However, physical training mitigated autophagosomes accumulation and attenuated apoptosis in the peri-infarct region while improving the modified neurological severity score scale. Physical training could also upregulate IGF-1 expression, which is known to attenuate autophagy and also to promote neurogenesis [75].

In addition, several studies reported that neuronal death in both the striatum and the cerebral cortex caused a degeneration of nigral dopaminergic neurons that are known to contribute to regulating motor activity [77]. However, treadmill training promoted axon regeneration of newborn striatonigral and corticonigral projection neurons in ischemic brain while improving motor function. It was thus suggested that exercise could enhance restoration of functional neural circuitry within the basal ganglia. The cerebellum plays an important role in the motor coordination, learning, and equilibrium and also seems to be involved in motor deficits following cerebral injury. Therefore, it is not surprising that treadmill training promoted both synaptogenesis and neurite outgrowth via 25-kDa synaptosomal-associated protein expression in the cerebellum. Likewise, such training also increased glial fibrillary acidic protein in the cerebellum, which plays a role in axonal growth, and improved motor coordination as observed with the rotarod test (longer time to fall from the rotating rod) [47].

Disruption of the BBB, increasing thus its permeability, is one of the major contributors to the pathogenesis of cerebral ischemia. Such event was observed when matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is strongly upregulated that impairs the extracellular matrix of the BBB [78, 79]. However, physical training attenuated BBB disruption as revealed by a decrease of MMP-9 expression and a parallel increase expression of MMP-9 inhibitor, the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1). Interestingly, such mechanisms might contribute to decreasing the observed neurological deficits, infarct volume, and brain edema [80].

These neuroplasticity processes require energy from mitochondria. However, cerebral ischemia induces damage of the cerebral mitochondria biogenesis, contributing to the extent of neuronal ischemic injury [81]. Nevertheless, 7-day endurance training increased mitochondrial biogenesis after cerebral ischemia by enhancing both the amount of mitochondrial DNA and the expression of numerous mitochondrial biogenesis factors such as the mitochondrial transcription factor proliferator activated receptor coactivator-1 (PGC-1), nuclear respiratory factor 1 (NRF-1) protein, and mitochondrial transcription factor A (TFAM) [82]. It was suggested that these events are involved in decreasing infarct volume and the improvement of neurological score.

Very few studies using rat model of cerebral ischemia enable better understanding of the treadmill training outcomes on muscle activation regulation. Cerebral ischemia is believed to affect synaptic activity including the cholinergic system, which leads to decreasing both neuromuscular junction and cholinergic brain synaptic transmission. It was shown that aerobic treadmill training (20 min/day, during 21 days) improved cholinergic system regulation/homeostasis by decreasing acetylcholinesterase activity (i.e., hydrolyzing

the acetylcholine) and by enhancing choline acetyltransferase activity (i.e., synthesis of acetylcholine) [53]. It was thus suggested that such adaptation might allow better motor limb function as indicated by improvement of the limb placement test score. Moreover, 10 days of treadmill training improved balance, functional outcome (behavioral score), and motor coordination. Indeed, the asymmetry of muscle activation pattern between affected and unaffected hindlimbs was restored because the EMG burst duration was increased at the affected side [83]. Muscle fatigue observed during locomotion was reduced as indicated by the increase of MPF at the unaffected side (see Section 2) [4].

A previous human study indicated that effective gait training on treadmill with body weight support, improving walking speed and endurance, was characterized by an increase of brain activity in the bilateral primary sensorimotor cortices, the cingulate motor areas, the caudate nuclei bilaterally, and the thalamus of the affected hemisphere during paretic foot movement [84]. In addition, treadmill exercise (improving cardiovascular fitness by 18%) activates subcortical neural networks during single knee movements of the lower extremity, as observed by fMRI. Indeed, physical training changed brain activation during paretic limb movement, showing 72% and 18% increased activation in posterior cerebellar lobe and midbrain, respectively [85]. After 10 weeks of training, the improvement in sensorimotor function, assessed with the Fugl-Meyer Index, seemed strongly related to the improvement in aerobic capacity [86].

It is noteworthy that some neural mechanisms after physical exercise remain to be investigated such as diaschisis. Indeed, functional deficits may also be associated with distant effects after subcortical lesions resulting from deafferentation to a region not directly involved in the stroke. Moreover, it was found that several rehabilitation exercises, inducing blood flow and metabolic changes in the contralesional hemisphere, might act on diaschisis. Given that alleviation of diaschisis could contribute to motor recovery [87], it seems important that further studies will determine how endurance exercises may influence diaschisis after cerebral ischemia.

#### **4. Influence of Exercise Parameters on Neuroplasticity and Functional Outcomes**

Depending on the chosen exercise parameters (volume, intensity, session frequency, and timing of exercise initiation), neuroplasticity can be either adaptive or maladaptive to recovery and, thus, may affect the training effectiveness after cerebral ischemia [46, 87–91]. Strong evidence suggested a time-limited period of enhanced neuroplasticity [89, 92–94]. Animal studies underlined that the limb function was less improved when training started before 24 h after ischemia compared with a start during the 5 first days [89]. Moreover, early intense training might induce larger cortical infarct volume and thalamic atrophy when the program starts before 24 h [95]. Exercise detrimental effects were also observed on neuroplasticity when animals performed treadmill exercise shortly after trauma [96]. The lesional aggravation might be related to localized and prolonged hyperthermia. Indeed, physical exercise, known to induce hyperthermia,

could accentuate the cerebral ischemia-induced release of glutamate and catecholamines that lead to neural excitotoxicity [95, 97]. However, it seems important to add that other processes than hyperthermia might be involved in the sensorimotor deficit aggravations and need to be explored. Furthermore, early running training downregulated proteins involved in neuroplasticity such as MAPK, CAMKII, PKC, synapsin I, or CREB expression [98] and decreased the level of proinflammatory cytokines known to be related to neuroprotection [99, 100]. Finally, Yagita et al. (2006) had shown that two weeks of running exercise reduced the number of newborn neurons in ischemic rats and thus limited neurogenesis in the hippocampus [101]. The author suggested that running was too stressful and enhanced the corticosterone level, known to decrease neurogenesis. Likewise, an immediate overuse of the lesioned forelimb could also increase tissue loss around the lesion and aggravated sensorimotor deficits on a longer term [102–104]. One explanation could be related to anatomical damage resulting from the reduction of dendritic growth in the ischemic hemisphere [104].

In addition, an augmented volume of exercise or increase of inpatient therapy duration for stroke did not indicate superior effects on functional recovery and activities of daily living [105, 106]. Interestingly, when healthy active men were subjected to a strong increase of volume training, physical performance was also not improved [107]. It thus seems that volume is not the main exercise parameter that should be investigated for improving aerobic program.

Greater improvements were observed with higher exercise intensities after stroke and neurodegenerative disease but also for healthy individuals [92, 108–110]. However, the effect of intensity on neuroplasticity remains unclear because it is poorly investigated in stroke patients or in ischemic animal models (ongoing study in our laboratory). It should also be pointed that one major methodological limitation is related to the exercise intensity determination. Indeed, training intensity was mainly based on maximal oxygen consumption or maximal exercise heart rate (or even intensity based on empirical values). However, these parameters were not appropriated because stroke patients never reached maximal capabilities. It was recently suggested that prescribing intensity should rather be based on submaximal parameters such as ventilatory or lactic threshold that were more accurate in distinguishing moderate to intense exercise [111].

## **5. Beneficial Effect of Physical Training Rehabilitation in Combination with Pharmacological Treatments**

Using multiple recovery processes (physical exercise and pharmacologic treatments) may be critical for enhancing functional outcomes, in contrast to monotherapies targeting single mechanisms (Table 1).

Given that recent findings have established that anti-inflammation may be an important target for stroke treatment [112], some authors demonstrated that combination of skilled reaching training with indomethacin or minocycline accentuated recovery [10]. First, beneficial effects of

such combination included an improvement of sensorimotor function as indicated by higher correct placements of the impaired forelimb during a walking task. Secondly, the number of proliferating microglia was more reduced and the survival of newborn astrocytes in the peri-infarct zone was increased compared to rats that underwent training alone. Authors suggested that the motor outcome improvement might be partially explained by the observed changes of neural response.

In addition, therapeutic drug such as S-nitrosoglutathione (GSNO) exhibits similar neurovascular protecting effects compared to physical training following traumatic brain trauma and cerebral ischemia in rats [18, 27]. Administration of GSNO could reduce neuronal apoptotic cell death, excitotoxicity, and inflammation as well as protecting BBB integrity. GSNO could also stimulate the expression of VEGF and BDNF after traumatic brain injury. Several authors have demonstrated that combining rotating rod motor exercise with GSNO administration accelerated and accentuated both walking and balance abilities compared to the effects induced by each treatment applied separately. Moreover, the improved motor function was associated with a reduction of both infarct volume and neuronal cell death as well as an increase of PECAM-1 and BDNF expression [28].

D-amphetamine, acting primarily through norepinephrine and dopamine mechanisms, is a potent modulator of neurological function and cortical excitation that facilitated motor skill abilities [113]. It was demonstrated that a single injection of D-amphetamine on the first day of training facilitates effectiveness of motor skill training compared with D-amphetamine treatment alone after a focal cortical infarct in squirrel monkeys [29]. However, administration of a high dose of D-amphetamine combined with rehabilitation training failed to promote fine motor recovery in a rat embolic stroke model. Authors explained this result by the fact that the dose of D-amphetamine was too high, thereby limiting animal engagement in the staircase test [114].

Other pharmacological agents could improve motor recovery by focusing on different neural mechanisms. For example, Nogo-A protein, a myelin-associated inhibitor, appears to be partially responsible for inhibition of axonal growth in white matter. Therefore, suppressing this myelin-associated neurite outgrowth inhibitor by specific antagonists of Nogo-A, such as NEP 1-40 or NGR(310)Ecto-FC, increased neurite outgrowth and axonal regeneration after stroke [30, 31]. Five-week motor training combined with NEP 1-40 treatment accelerated motor recovery (skilled reach and foot fault tests) from the first week after cerebral ischemia compared to treatments applied alone in which beneficial effects were observed later (weeks 2 and 4) [30]. Unfortunately, neural plasticity mechanisms underlying this improvement remain unknown, but these findings showed that this therapy combination could accelerate the recovery process following cerebral ischemia.

Neurons and glial cells in brain can synthesize progesterone that exhibits neuroprotective effects after cerebral ischemia [115–118]. Rehabilitation could increase reorganization of cortical maps whereas the progesterone might reduce the infarct volume through its neuroprotective effect by

TABLE 1: Influence of pharmacological agents associated with physical exercise on motor recovery after brain stroke.

Drug agents	Targets	Results	References
Indomethacin Minocycline	Inflammatory processes	$\searrow$ infarct volume (indomethacin only) $\nearrow$ sensorimotor performance $\searrow$ microglia $\nearrow$ astroglia	[10]
GSNO	Oxidative stress Inflammatory processes Excitotoxicity	$\searrow$ infarct volume, apoptotic cell death $\nearrow$ neurological score, motor recovery, and survival rate $\nearrow$ CBF, synaptic plasticity, and BBB leakage $\searrow$ TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and iNOS	[18, 27, 28]
D-Amphetamine	Noradrenergic $\alpha$ 1-receptor agonist	$\nearrow$ motor recovery	[29]
NEP 1-40	Nogo-A protein inhibitor	$\nearrow$ early motor recovery $\nearrow$ axonal growth	[30]
NgR(310)Ecto-Fc	Nogo-NgR pathway inhibitor	$\nearrow$ motor recovery $\nearrow$ axonal plasticity	[31]
Progesterone	Excitotoxicity Inflammatory processes	$\searrow$ infarct volume $\nearrow$ forelimbs strength and motor recovery	[32]
EGF* and EPO*	Neuron proliferation, migration, and differentiation	$\nearrow$ accelerated fine motor recovery	[33, 34]
Chondroitinase ABC	Chondroitin sulphate proteoglycans (CSPGs)	$\searrow$ CSPGs $\nearrow$ synaptic plasticity $\nearrow$ motor recovery	[35]

$\nearrow$  indicates an increase and  $\searrow$  a decrease, respectively; NEP 1-40: NOGO extracellular peptide; EGF: epidermal growth factor; EPO: erythropoietin; GSNO: S-nitrosoglutathione; CBF: cerebral blood flow; BDNF: brain derived neurotrophic factor; trkB: tropomyosin receptor kinase B; BBB: blood brain barrier. \*Molecules combination.

targeting excitotoxicity. Although this combination had no additional effect in reducing infarct volume, functional recovery effectiveness was promoted as shown by the increased rotarod performance and forelimb grip strength at all time points within 7 days after ischemic stroke [32].

In addition, some authors indicated that combination of two pharmacological treatments could improve functional recovery and neural plasticity compared to either treatment alone. For example, association of epidermal growth factor (EGF) and erythropoietin (EPO) treatments is more effective in promoting tissue regeneration and proliferation of neural precursor cells than monotherapy [33]. However, an even greater improvement in skilled reaching ability in the staircase test was observed when physical rehabilitation was added to serial application of both EGF and EPO [34]. Authors have also indicated that fine motor skill improvement was observed 10 weeks after functional rehabilitation alone whereas 4-week-long treatment combination was sufficient to improve sensorimotor function. It means that functional recovery is also clearly accelerated with this combination.

Another strategy consists of recreating a tissue environment free from growth inhibiting molecules. Chondroitinase ABC, which degrades inhibitory chondroitin sulphate proteoglycans present in the extracellular matrix, reduces the neurite-inhibitory environment and facilitates axonal sprouting and sensorimotor recovery after spinal cord injury [119, 120] and after cerebral ischemia [121, 122]. This treatment was applied at the ipsilesional cortex in rats in combination with functional rehabilitation. Synaptic plasticity, assessed by

measuring the expression of glutamate vesicular transporter (vGLUT1 and vGLUT2) and the GABA vesicular transporter (vGAT), and functional recovery were promoted by the synergic effect of these treatments [35].

Given that some promising treatments developed in preclinical studies failed to be effective in clinical studies [123, 124], it seems crucial to assess the pharmacological effectiveness in stroke patients before combining it with physical exercise. Therefore, we need to keep in mind that not all the effective combinations found in animal studies could be considered effective for human. Nevertheless, assessing both treatments and exercise in rodent models seems relevant to found new therapeutic strategies to highlight the most effective and applicable strategies for human.

## 6. Influence of Prestroke Physical Activity on Motor Dysfunction Severity

To avoid administration of several pharmacological substances in individuals with high risks of stroke (may induce deleterious interaction between drugs and complications due to their side effects), physical activity might be a major alternative preventive strategy for reducing the brain secondary injury when stroke occurs. Several recent human and animal studies have well demonstrated that preischemic physical activity may reduce initial stroke severity on functional motor outcomes, edema, and infarct volume by acting on inflammation, vascular processes, BDNF expression, and metabolic disorders [14, 16, 17, 125, 126].

Ischemia-induced brain inflammation is believed to play a pivotal role in the development of secondary brain injury by intensifying the inflammatory cell accumulation and microvascular impairments. Indeed, adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) promote leukocyte infiltration into injury site and leukocyte adhesion to microvascular endothelium. Preischemic physical training-induced neuroprotection was associated with a decrease in ICAM-1 mRNA expression and in the number of ICAM-1-positive vessels [17]. Consequently, leukocyte accumulation in damaged cortex and striatum vessels decreased, resulting in reduction of brain inflammation during reperfusion.

Brain angiogenesis is another neuroprotective mechanism for reducing the detrimental motor effect of cerebral ischemia. Physical training prior to cerebral ischemia increased short- and long-term effects on microvascular density and cerebral blood flow by promoting angiogenesis and increasing cerebral vasomotor reactivity. It was found that preischemic exercise improved vasorelaxation by enhancing VEGF levels into the ischemic region, which is known to activate eNOS and EPCs recruitment [8, 19]. Likewise, exercise decreased the endothelin-1 (a powerful vasoconstrictor agent) expression, thereby reducing the impact of vasoconstriction on cerebral blood flow [127].

Preischemic training could also attenuate brain damage by limiting metabolic disorders after cerebral ischemia. Indeed, 5'AMP-activated protein kinase (AMPK), phosphofruktokinase-1 (PFK), and hypoxia-induced factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), involved in glycolysis [18, 128], were significantly higher in preischemic trained rats [129]. Moreover, the increase of glucose transporters in neurons and endothelial cells of the BBB (GLUT3 and GLUT1, resp.) results in an improved glucose oxidation immediately after cerebral ischemia, allowing a faster and more substantial increase in ATP production.

Moreover, it was postulated that preischemic exercise (30 min on a treadmill, 5 days/week for 3 weeks) decreases BBB dysfunctions and, thus, reduces infarct volume and edema as confirmed by the MMP-9 expression decrement [130, 131]. Preischemic treadmill training-induced neuroprotection in ischemic rats increased endogenous BDNF expression that leads to motor recovery improvement [16, 17, 67, 132]. Interestingly, the preischemic treadmill exercise improved the therapeutic effectiveness of postischemic treadmill training on motor function compared with animals performing it only after cerebral ischemia [53].

Neuronal excitotoxicity induced by excessive glutamate release is a major deleterious event of the brain secondary injury [133, 134]. It was found that preischemic treadmill training could also reduce the expression of glutamate receptors, mGluR5 and NR2B, reflecting a decrease of glutamate effect on surrounding cells [135–137]. Moreover, it was postulated that the reduction of infarct volume induced by 12 weeks of treadmill might be related to increase of NGF expression and this receptor, p75, known to promote neuroprotection against excitotoxicity and free-radical damage [138].

Individuals who were physically active prior to stroke have been shown to exhibit less deleterious functional outcomes, as indicated by higher Barthel Index scores as well as Oxford Handicap Scale [14, 15]. Indeed, it was recently revealed that patients with high levels of prestroke physical activity were associated with milder stroke severity at admission, with faster early motor improvement and with a lower final infarct volume [139]. Interestingly, it seems that simply walking 1 h/day during 5 days per week or doing a vigorous aerobic activity 1 h/day twice a week is sufficient to induce preventive effects. However, findings remain conflicting in human studies because no strong association between higher levels of physical activity and better functional outcomes after stroke was found in a large prospective cohort [126].

## 7. Conclusion

Although acute exercise appears to be useful for better understanding neural and motor recovery mechanisms, few studies have used this experimental model to investigate stroke physiopathology. Neural adaptations remain thus unclear. Furthermore, physical training appears to be promising to improve functional motor recovery by promoting neuroplasticity at different cellular and molecular levels. These beneficial effects seem accelerated and/or accentuated when exercise is combined with an additional pharmacological treatment. Nevertheless, optimal parameters of training and treatment need to be investigated to maximize/accelerate neuroplasticity and motor recovery and avoid undesirable effects of exercise. All these findings could help researchers and therapists to justify the effectiveness of their physical training programs in order to increase the patient willingness to regularly perform physical activity before and after stroke.

## Conflict of Interests

Each author of the present review declared no conflict of interests.

## Acknowledgment

The authors are grateful to Dr. Vincent Pertici for comments on earlier version of this paper.

## References

- [1] E. Broussalis, M. Killer, M. McCoy, A. Harrer, E. Trinka, and J. Kraus, "Current therapies in ischemic stroke. Part A. Recent developments in acute stroke treatment and in stroke prevention," *Drug Discovery Today*, vol. 17, no. 7-8, pp. 296–309, 2012.
- [2] F. M. Ivey, R. F. Macko, A. S. Ryan, and C. E. Hafer-Macko, "Cardiovascular health and fitness after stroke," *Topics in Stroke Rehabilitation*, vol. 12, no. 1, pp. 1–16, 2005.
- [3] D. L. Marsden, A. Dunn, R. Callister, C. R. Levi, and N. J. Spratt, "Characteristics of exercise training interventions to improve cardiorespiratory fitness after stroke: a systematic review with meta-analysis," *Neurorehabilitation and Neural Repair*, vol. 27, no. 9, pp. 775–788, 2013.

- [4] L. Li, W. Rong, Z. Ke, X. Hu, S. P. Yip, and K. Y. Tong, "Muscle activation changes during body weight support treadmill training after focal cortical ischemia: a rat hindlimb model," *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 21, no. 2, pp. 318–326, 2011.
- [5] C. Pin-Barre, J. Laurin, M.-S. Felix et al., "Acute neuromuscular adaptation at the spinal level following middle cerebral artery occlusion-reperfusion in the rat," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 2, Article ID e89953, 2014.
- [6] L. W. Forrester, D. F. Hanley, and R. F. Macko, "Effects of treadmill exercise on transcranial magnetic stimulation-induced excitability to quadriceps after stroke," *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, vol. 87, no. 2, pp. 229–234, 2006.
- [7] R. F. Macko, F. M. Ivey, L. W. Forrester et al., "Treadmill exercise rehabilitation improves ambulatory function and cardiovascular fitness in patients with chronic stroke: a randomized, controlled trial," *Stroke*, vol. 36, no. 10, pp. 2206–2211, 2005.
- [8] M. Endres, K. Gertz, U. Lindauer et al., "Mechanisms of stroke protection by physical activity," *Annals of Neurology*, vol. 54, no. 5, pp. 582–590, 2003.
- [9] K. Gertz, J. Priller, G. Kronenberg et al., "Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow," *Circulation Research*, vol. 99, no. 10, pp. 1132–1140, 2006.
- [10] S. Liebigt, N. Schlegel, J. Oberland, O. W. Witte, C. Redecker, and S. Keiner, "Effects of rehabilitative training and anti-inflammatory treatment on functional recovery and cellular reorganization following stroke," *Experimental Neurology*, vol. 233, no. 2, pp. 776–782, 2012.
- [11] W.-R. Schäbitz, T. Steigleder, C. M. Cooper-Kuhn et al., "Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis," *Stroke*, vol. 38, no. 7, pp. 2165–2172, 2007.
- [12] D. Wu and W. M. Pardridge, "Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 1, pp. 254–259, 1999.
- [13] I.-M. Lee, C. H. Hennekens, K. Berger, J. E. Buring, and J. E. Manson, "Exercise and risk of stroke in male physicians," *Stroke*, vol. 30, no. 1, pp. 1–6, 1999.
- [14] D. Deplanque, I. Masse, C. Lefebvre, C. Libersa, D. Leys, and R. Bordet, "Prior TIA, lipid-lowering drug use, and physical activity decrease ischemic stroke severity," *Neurology*, vol. 67, no. 8, pp. 1403–1410, 2006.
- [15] N. Stroud, T. M. L. Mazwi, L. D. Case et al., "Prestroke physical activity and early functional status after stroke," *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, vol. 80, no. 9, pp. 1019–1022, 2009.
- [16] Y. Ding, J. Li, X. Luan et al., "Exercise pre-conditioning reduces brain damage in ischemic rats that may be associated with regional angiogenesis and cellular overexpression of neurotrophin," *Neuroscience*, vol. 124, no. 3, pp. 583–591, 2004.
- [17] Y.-H. Ding, C. N. Young, X. Luan et al., "Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion," *Acta Neuropathologica*, vol. 109, no. 3, pp. 237–246, 2005.
- [18] M. Khan, B. Sekhon, S. Giri et al., "S-Nitrosoglutathione reduces inflammation and protects brain against focal cerebral ischemia in a rat model of experimental stroke," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 25, no. 2, pp. 177–192, 2005.
- [19] W. Schmidt, M. Endres, F. Dimeo, and G. J. Jungehulsing, "Train the vessel, gain the brain: physical activity and vessel function and the impact on stroke prevention and outcome in cerebrovascular disease," *Cerebrovascular Diseases*, vol. 35, no. 4, pp. 303–312, 2013.
- [20] W. R. Frontera, L. Grimby, and L. Larsson, "Firing rate of the lower motoneuron and contractile properties of its muscle fibers after upper motoneuron lesion in man," *Muscle & Nerve*, vol. 20, no. 8, pp. 938–947, 1997.
- [21] C. M. Cirstea, C. R. Savage, R. J. Nudo et al., "Handgrip-related activation in the primary motor cortex relates to underlying neuronal metabolism after stroke," *Neurorehabilitation and Neural Repair*, vol. 28, no. 5, pp. 433–442, 2013.
- [22] C. Enzinger, H. Johansen-Berg, H. Dawes et al., "Functional MRI correlates of lower limb function in stroke victims with gait impairment," *Stroke*, vol. 39, no. 5, pp. 1507–1513, 2008.
- [23] A. R. Luft, L. Forrester, R. F. Macko et al., "Brain activation of lower extremity movement in chronically impaired stroke survivors," *NeuroImage*, vol. 26, no. 1, pp. 184–194, 2005.
- [24] A. R. Luft, S. Waller, L. Forrester et al., "Lesion location alters brain activation in chronically impaired stroke survivors," *NeuroImage*, vol. 21, no. 3, pp. 924–935, 2004.
- [25] N. S. Ward, "Functional reorganization of the cerebral motor system after stroke," *Current Opinion in Neurology*, vol. 17, no. 6, pp. 725–730, 2004.
- [26] A. C. Zemke, P. J. Heagerty, C. Lee, and S. C. Cramer, "Motor cortex organization after stroke is related to side of stroke and level of recovery," *Stroke*, vol. 34, no. 5, pp. e23–e28, 2003.
- [27] M. Khan, H. Sakakima, T. S. Dhammu et al., "S-nitrosoglutathione reduces oxidative injury and promotes mechanisms of neurorepair following traumatic brain injury in rats," *Journal of Neuroinflammation*, vol. 8, article 78, 2011.
- [28] H. Sakakima, M. Khan, T. S. Dhammu et al., "Stimulation of functional recovery via the mechanisms of neurorepair by S-nitrosoglutathione and motor exercise in a rat model of transient cerebral ischemia and reperfusion," *Restorative Neurology and Neuroscience*, vol. 30, no. 5, pp. 383–396, 2012.
- [29] S. Barbay, E. V. Zoubina, N. Dancause et al., "A single injection of D-amphetamine facilitates improvements in motor training following a focal cortical infarct in squirrel monkeys," *Neurorehabilitation and Neural Repair*, vol. 20, no. 4, pp. 455–458, 2006.
- [30] P.-C. Fang, S. Barbay, E. J. Plautz, E. Hoover, S. M. Strittmatter, and R. J. Nudo, "Combination of NEP 1-40 treatment and motor training enhances behavioral recovery after a focal cortical infarct in rats," *Stroke*, vol. 41, no. 3, pp. 544–549, 2010.
- [31] J.-K. Lee, J.-E. Kim, M. Sivula, and S. M. Strittmatter, "Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity," *The Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 27, pp. 6209–6217, 2004.
- [32] J. Wang, X. Feng, Y. Du, L. Wang, and S. Zhang, "Combination treatment with progesterone and rehabilitation training further promotes behavioral recovery after acute ischemic stroke in mice," *Restorative Neurology and Neuroscience*, vol. 31, no. 4, pp. 487–499, 2013.
- [33] B. Kolb, C. Morshead, C. Gonzalez et al., "Growth factor-stimulated generation of new cortical tissue and functional recovery after stroke damage to the motor cortex of rats," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 27, no. 5, pp. 983–997, 2007.
- [34] M. S. Jeffers, A. Hoyles, C. Morshead, and D. Corbett, "Epidermal growth factor and erythropoietin infusion accelerate

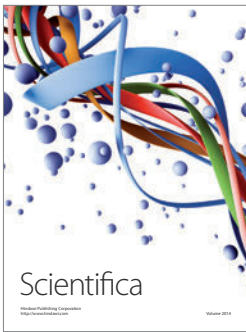
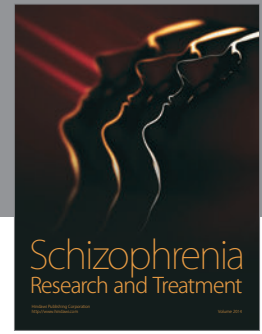
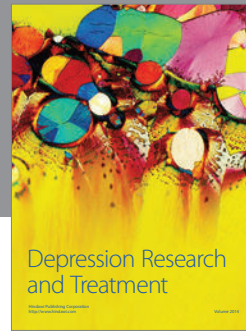
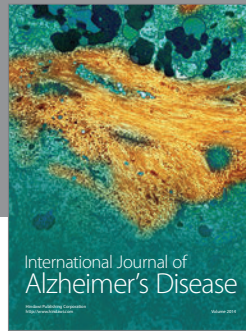
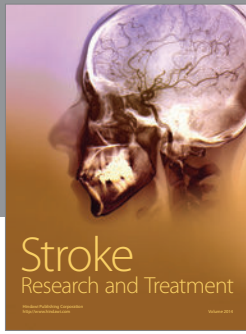
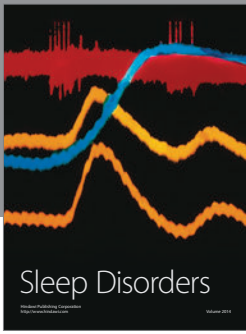
- functional recovery in combination with rehabilitation,” *Stroke*, vol. 45, no. 6, pp. 1856–1858, 2014.
- [35] L. Gherardini, M. Gennaro, and T. Pizzorusso, “Perilesional treatment with chondroitinase ABC and motor training promote functional recovery after stroke in rats,” *Cerebral Cortex*, vol. 25, no. 1, pp. 202–212, 2015.
- [36] D. P. Fuchs, N. Sanghvi, J. Wieser, and S. Schindler-Ivens, “Pedaling alters the excitability and modulation of vastus medialis H-reflexes after stroke,” *Clinical Neurophysiology*, vol. 122, no. 10, pp. 2036–2043, 2011.
- [37] I.-S. Hwang, C.-F. Lin, L.-C. Tung, and C.-H. Wang, “Responsiveness of the H reflex to loading and posture in patients following stroke,” *Journal of Electromyography and Kinesiology*, vol. 14, no. 6, pp. 653–659, 2004.
- [38] M. A. Oskoei and H. Hu, “Support vector machine-based classification scheme for myoelectric control applied to upper limb,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 55, no. 8, pp. 1956–1965, 2008.
- [39] G. L. Soderberg and L. M. Knutson, “A guide for use and interpretation of kinesiologic electromyographic data,” *Physical Therapy*, vol. 80, no. 5, pp. 485–498, 2000.
- [40] N. A. Riley and M. Bilodeau, “Changes in upper limb joint torque patterns and EMG signals with fatigue following a stroke,” *Disability and Rehabilitation*, vol. 24, no. 18, pp. 961–969, 2002.
- [41] U. M. Svantesson, K. S. Sunnerhagen, U. S. Carlsson, and G. Grimby, “Development of fatigue during repeated eccentric-concentric muscle contractions of plantar flexors in patients with stroke,” *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, vol. 80, no. 10, pp. 1247–1252, 1999.
- [42] K. N. Arya, S. Pandian, R. Verma, and R. K. Garg, “Movement therapy induced neural reorganization and motor recovery in stroke: a review,” *Journal of Bodywork and Movement Therapies*, vol. 15, no. 4, pp. 528–537, 2011.
- [43] R. J. Nudo, “Neural bases of recovery after brain injury,” *Journal of Communication Disorders*, vol. 44, no. 5, pp. 515–520, 2011.
- [44] T. Kawamata, N. E. Alexis, W. D. Dietrich, and S. P. Finklestein, “Intracisternal basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances behavioral recovery following focal cerebral infarction in the rat,” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 16, no. 4, pp. 542–547, 1996.
- [45] T. Yamaguchi, M. Suzuki, and M. Yamamoto, “YM796, a novel muscarinic agonist, improves the impairment of learning behavior in a rat model of chronic focal cerebral ischemia,” *Brain Research*, vol. 669, no. 1, pp. 107–114, 1995.
- [46] F. Matsuda, H. Sakakima, and Y. Yoshida, “The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats,” *Acta Physiologica*, vol. 201, no. 2, pp. 275–287, 2011.
- [47] K. Mizutani, S. Sonoda, N. Hayashi et al., “Analysis of protein expression profile in the cerebellum of cerebral infarction rats after treadmill training,” *American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, vol. 89, no. 2, pp. 107–114, 2010.
- [48] P. Zhang, Y. Zhang, J. Zhang et al., “Early exercise protects against cerebral ischemic injury through inhibiting neuron apoptosis in cortex in rats,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 3, pp. 6074–6089, 2013.
- [49] L. M. Cupini, M. Diomedì, F. Placidi, M. Silvestrini, and P. Giacomini, “Cerebrovascular reactivity and subcortical infarctions,” *Archives of Neurology*, vol. 58, no. 4, pp. 577–581, 2001.
- [50] F. M. Ivey, A. S. Ryan, C. E. Hafer-Macko, and R. F. MacKo, “Improved cerebral vasomotor reactivity after exercise training in hemiparetic stroke survivors,” *Stroke*, vol. 42, no. 7, pp. 1994–2000, 2011.
- [51] S. Tian, Y. Zhang, S. Tian et al., “Early exercise training improves ischemic outcome in rats by cerebral hemodynamics,” *Brain Research*, vol. 1533, pp. 114–121, 2013.
- [52] Y. Gao, Y. Zhao, J. Pan et al., “Treadmill exercise promotes angiogenesis in the ischemic penumbra of rat brains through caveolin-1/VEGF signaling pathways,” *Brain Research*, vol. 1585, pp. 83–90, 2014.
- [53] G. Kim and E. Kim, “Effects of treadmill training on limb motor function and acetylcholinesterase activity in rats with stroke,” *Journal of Physical Therapy Science*, vol. 25, no. 10, pp. 1227–1230, 2013.
- [54] Q. Zheng, D. Zhu, Y. Bai, Y. Wu, J. Jia, and Y. Hu, “Exercise improves recovery after ischemic brain injury by inducing the expression of angiopoietin-1 and Tie-2 in rats,” *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, vol. 224, no. 3, pp. 221–228, 2011.
- [55] T. M. Hansen, A. J. Moss, and N. P. J. Brindle, “Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in neurovascular regeneration and protection following stroke,” *Current Neurovascular Research*, vol. 5, no. 4, pp. 236–245, 2008.
- [56] D. M. Hermann and A. Zechariah, “Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling,” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 29, no. 10, pp. 1620–1643, 2009.
- [57] C. S. Mang, K. L. Campbell, C. J. D. Ross, and L. A. Boyd, “Promoting neuroplasticity for motor rehabilitation after stroke: considering the effects of aerobic exercise and genetic variation on brain-derived neurotrophic factor,” *Physical Therapy*, vol. 93, no. 12, pp. 1707–1716, 2013.
- [58] M. Ploughman, V. Windle, C. L. MacLellan, N. White, J. J. Doré, and D. Corbett, “Brain-derived neurotrophic factor contributes to recovery of skilled reaching after focal ischemia in rats,” *Stroke*, vol. 40, no. 4, pp. 1490–1495, 2009.
- [59] I. Kiprianova, T. M. Freiman, S. Desiderato et al., “Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat,” *Journal of Neuroscience Research*, vol. 56, no. 1, pp. 21–27, 1999.
- [60] R. J. Nudo, E. J. Plautz, and S. B. Frost, “Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex,” *Muscle & Nerve*, vol. 24, no. 8, pp. 1000–1019, 2001.
- [61] W.-R. Schäbitz, S. Schwab, M. Spranger, and W. Hacke, “Intra-ventricular 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.
- [62] W.-R. Schäbitz, 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.
- [63] M.-W. Kim, M.-S. Bang, T.-R. Han et al., “Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain,” *Brain Research*, vol. 1052, no. 1, pp. 16–21, 2005.
- [64] Z. Kokaia, Q. Zhao, M. Kokaia et al., “Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage,” *Experimental Neurology*, vol. 136, no. 1, pp. 73–88, 1995.
- [65] L. R. Zhao, B. Mattsson, and B. B. Johansson, “Environmental influence on brain-derived neurotrophic factor messenger RNA



- expression after middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats," *Neuroscience*, vol. 97, no. 1, pp. 177–184, 2000.
- [66] 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.
- [67] W.-R. Schäbitz, C. Berger, R. Kollmar et al., "Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia," *Stroke*, vol. 35, no. 4, pp. 992–997, 2004.
- [68] J. Chen, J. Qin, Q. Su, Z. Liu, and J. Yang, "Treadmill rehabilitation treatment enhanced BDNF-TrkB but not NGF-TrkA signaling in a mouse intracerebral hemorrhage model," *Neuroscience Letters*, vol. 529, no. 1, pp. 28–32, 2012.
- [69] J.-Y. Chung, M.-W. Kim, M.-S. Bang, and M. Kim, "Increased expression of neurotrophin 4 following focal cerebral ischemia in adult rat brain with treadmill exercise," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 3, Article ID e52461, 2013.
- [70] Z. Ke, S. P. Yip, L. Li, X. X. Zheng, W. K. Tam, and K. Y. Tong, "The effects of voluntary, involuntary, and forced exercises on motor recovery in a stroke rat model," in *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC '11)*, vol. 2011, pp. 8223–8226, Boston, Mass, USA, August 2011.
- [71] P.-C. Shih, Y.-R. Yang, and R.-Y. Wang, "Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 10, Article ID e78163, 2013.
- [72] J. Sun, Z. Ke, S. P. Yip, X.-L. Hu, X.-X. Zheng, and K.-Y. Tong, "Gradually increased training intensity benefits rehabilitation outcome after stroke by BDNF upregulation and stress suppression," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 925762, 8 pages, 2014.
- [73] R. Marin, A. Williams, S. Hale et al., "The effect of voluntary exercise exposure on histological and neurobehavioral outcomes after ischemic brain injury in the rat," *Physiology and Behavior*, vol. 80, no. 2-3, pp. 167–175, 2003.
- [74] S. Vaynman, Z. Ying, and F. Gómez-Pinilla, "Exercise induces BDNF and synapsin I to specific hippocampal subfields," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 76, no. 3, pp. 356–362, 2004.
- [75] L. Zhang, X. Hu, J. Luo et al., "Physical exercise improves functional recovery through mitigation of autophagy, attenuation of apoptosis and enhancement of neurogenesis after MCAO in rats," *BMC Neuroscience*, vol. 14, article 46, 2013.
- [76] J. Puyal and P. G. H. Clarke, "Targeting autophagy to prevent neonatal stroke damage," *Autophagy*, vol. 5, no. 7, pp. 1060–1061, 2009.
- [77] Q.-W. Zhang, X.-X. Deng, X. Sun, J.-X. Xu, and F.-Y. Sun, "Exercise promotes axon regeneration of newborn striatonigral and corticonigral projection neurons in rats after ischemic stroke," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 11, Article ID e80139, 2013.
- [78] M. Asahi, K. Asahi, J.-C. Jung, G. J. del Zoppo, M. E. Fini, and E. H. Lo, "Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94," *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 20, no. 12, pp. 1681–1689, 2000.
- [79] M. Asahi, X. Wang, T. Mori et al., "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*, vol. 21, no. 19, pp. 7724–7732, 2001.
- [80] Y. Zhang, P. Zhang, X. Shen et al., "Early exercise protects the blood-brain barrier from ischemic brain injury via the regulation of MMP-9 and occludin in rats," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 14, no. 6, pp. 11096–11112, 2013.
- [81] I. G. Onyango, J. Lu, M. Rodova, E. Lezi, A. B. Crafter, and R. H. Swerdlow, "Regulation of neuron mitochondrial biogenesis and relevance to brain health," *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Basis of Disease*, vol. 1802, no. 1, pp. 228–234, 2010.
- [82] Q. Zhang, Y. Wu, P. Zhang et al., "Exercise induces mitochondrial biogenesis after brain ischemia in rats," *Neuroscience*, vol. 205, pp. 10–17, 2012.
- [83] L. Li, W. Rong, Z. Ke, X. Hu, and K.-Y. Tong, "The effects of training intensities on motor recovery and gait symmetry in a rat model of ischemia," *Brain Injury*, vol. 27, no. 4, pp. 408–416, 2013.
- [84] C. Enzinger, H. Dawes, H. Johansen-Berg et al., "Brain activity changes associated with treadmill training: after stroke," *Stroke*, vol. 40, no. 7, pp. 2460–2467, 2009.
- [85] A. R. Luft, R. F. MacKo, L. W. Forrester et al., "Treadmill exercise activates subcortical neural networks and improves walking after stroke: a randomized controlled trial," *Stroke*, vol. 39, no. 12, pp. 3341–3350, 2008.
- [86] K. Potempa, M. Lopez, L. T. Braun, J. P. Szidon, L. Fogg, and T. Tincknell, "Physiological outcomes of aerobic exercise training in hemiparetic stroke patients," *Stroke*, vol. 26, no. 1, pp. 101–105, 1995.
- [87] F. Buma, G. Kwakkel, and N. Ramsey, "Understanding upper limb recovery after stroke," *Restorative Neurology and Neuroscience*, vol. 31, no. 6, pp. 707–722, 2013.
- [88] A. E. Baird, A. Benfield, G. Schlaug et al., "Enlargement of human cerebral ischemic lesion volumes measured by diffusion-weighted magnetic resonance imaging," *Annals of Neurology*, vol. 41, no. 5, pp. 581–589, 1997.
- [89] A. Schmidt, J. Wellmann, M. Schilling et al., "Meta-analysis of the efficacy of different training strategies in animal models of ischemic stroke," *Stroke*, vol. 45, no. 1, pp. 239–247, 2014.
- [90] R.-Y. Wang, S.-M. Yu, and Y.-R. Yang, "Treadmill training effects in different age groups following middle cerebral artery occlusion in rats," *Gerontology*, vol. 51, no. 3, pp. 161–165, 2005.
- [91] P. Zhang, H. Yu, N. Zhou et al., "Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model," *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation*, vol. 10, article 43, 2013.
- [92] J. Laurin and C. Pin-Barre, "Physiological adaptations following endurance exercises after stroke: focus on the plausible role of high-intensity interval training," *International Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*, vol. 2, no. 3, pp. 1–6, 2014.
- [93] T. H. Murphy and D. Corbett, "Plasticity during stroke recovery: from synapse to behaviour," *Nature Reviews. Neuroscience*, vol. 10, no. 12, pp. 861–872, 2009.
- [94] M. Svensson, J. Lexell, and T. Deierborg, "Effects of physical exercise on neuroinflammation, neuroplasticity, neurodegeneration, and behavior: what we can learn from animal models in clinical settings," *Neurorehabilitation and Neural Repair*, vol. 29, no. 6, pp. 577–589, 2015.
- [95] A. Risedal, J. Zeng, and B. B. Johansson, "Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 19, no. 9, pp. 997–1003, 1999.

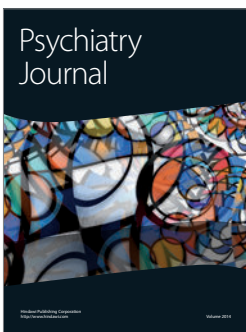
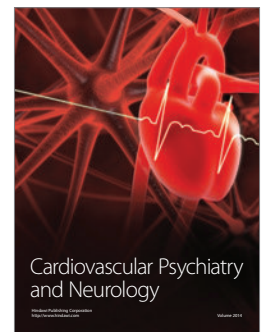
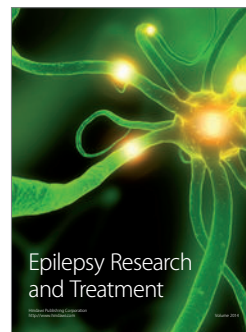
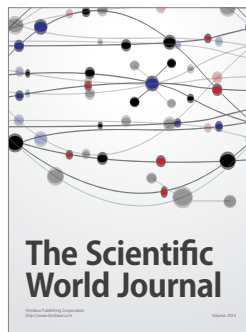
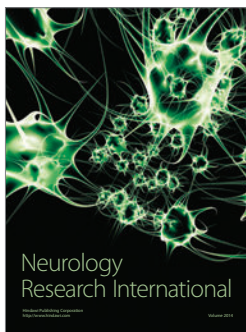
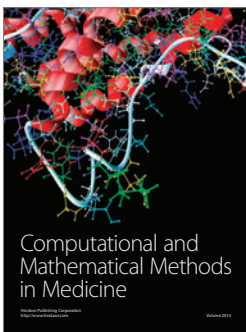
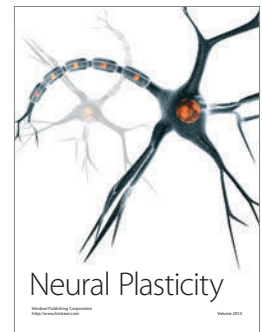
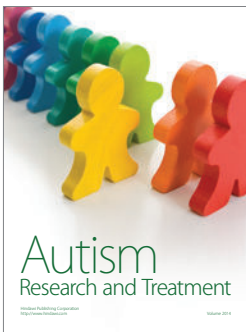
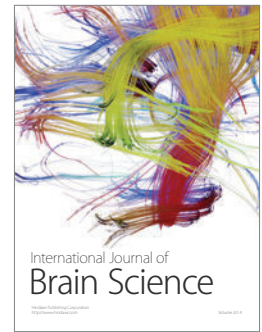
- [96] C.-S. Piao, B. A. Stoica, J. Wu et al., "Late exercise reduces neuroinflammation and cognitive dysfunction after traumatic brain injury," *Neurobiology of Disease*, vol. 54, pp. 252–263, 2013.
- [97] J. L. Humm, D. A. Kozlowski, S. T. Bland, D. C. James, and T. Schallert, "Use-dependent exaggeration of brain injury: is glutamate involved?" *Experimental Neurology*, vol. 157, no. 2, pp. 349–358, 1999.
- [98] G. S. Griesbach, F. Gomez-Pinilla, and D. A. Hovda, "The upregulation of plasticity-related proteins following TBI is disrupted with acute voluntary exercise," *Brain Research*, vol. 1016, no. 2, pp. 154–162, 2004.
- [99] J. W. McAlees, L. T. Smith, R. S. Erbe, D. Jarjoura, N. M. Ponzio, and V. M. Sanders, "Epigenetic regulation of beta2-adrenergic receptor expression in  $T_H1$  and  $T_H2$  cells," *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 25, no. 3, pp. 408–415, 2011.
- [100] G. Zhao, S. Zhou, A. Davie, and Q. Su, "Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance," *Exercise Immunology Review*, vol. 18, pp. 98–114, 2012.
- [101] Y. Yagita, K. Kitagawa, T. Sasaki et al., "Postischemic exercise decreases neurogenesis in the adult rat dentate gyrus," *Neuroscience Letters*, vol. 409, no. 1, pp. 24–29, 2006.
- [102] S. T. Bland, T. Schallert, R. Strong, J. Aronowski, and J. C. Grotta, "Early exclusive use of the affected forelimb after moderate transient focal ischemia in rats: functional and anatomic outcome," *Stroke*, vol. 31, no. 5, pp. 1144–1152, 2000.
- [103] S. B. DeBow, J. E. McKenna, B. Kolb, and F. Colbourne, "Immediate constraint-induced movement therapy causes local hyperthermia that exacerbates cerebral cortical injury in rats," *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 82, no. 4, pp. 231–237, 2004.
- [104] D. A. Kozlowski, D. C. James, and T. Schallert, "Use-dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions," *The Journal of Neuroscience*, vol. 16, no. 15, pp. 4776–4786, 1996.
- [105] B. Balaban, F. Tok, F. Yavuz, E. Yaşar, and R. Alaca, "Early rehabilitation outcome in patients with middle cerebral artery stroke," *Neuroscience Letters*, vol. 498, no. 3, pp. 204–207, 2011.
- [106] G. Kwakkel, R. van Peppen, R. C. Wagenaar et al., "Effects of augmented exercise therapy time after stroke: a meta-analysis," *Stroke*, vol. 35, no. 11, pp. 2529–2539, 2004.
- [107] D. L. Costill, M. G. Flynn, J. P. Kirwan et al., "Effects of repeated days of intensified training on muscle glycogen and swimming performance," *Medicine & Science in Sports & Exercise*, vol. 20, no. 3, pp. 249–254, 1988.
- [108] M. A. Hirsch and B. G. Farley, "Exercise and neuroplasticity in persons living with Parkinson's disease," *European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine*, vol. 45, no. 2, pp. 215–229, 2009.
- [109] M. Katz-Leurer, M. Shochina, E. Carmeli, and Y. Friedlander, "The influence of early aerobic training on the functional capacity in patients with cerebrovascular accident at the subacute stage," *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, vol. 84, no. 11, pp. 1609–1614, 2003.
- [110] J. D. Schaechter, "Motor rehabilitation and brain plasticity after hemiparetic stroke," *Progress in Neurobiology*, vol. 73, no. 1, pp. 61–72, 2004.
- [111] P. R. Bosch, S. Holzapfel, and T. Traustadottir, "Feasibility of measuring ventilatory threshold in adults with stroke-induced hemiparesis: implications for exercise prescription," *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2015.
- [112] D. P. Stirling, K. Khodarahmi, J. Liu et al., "Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury," *The Journal of Neuroscience*, vol. 24, no. 9, pp. 2182–2190, 2004.
- [113] S. Barbay and R. J. Nudo, "The effects of amphetamine on recovery of function in animal models of cerebral injury: a critical appraisal," *NeuroRehabilitation*, vol. 25, no. 1, pp. 5–17, 2009.
- [114] R. S. Rasmussen, K. Overgaard, E. S. Hildebrandt-Eriksen, and G. Boysen, "D-Amphetamine improves cognitive deficits and physical therapy promotes fine motor rehabilitation in a rat embolic stroke model," *Acta Neurologica Scandinavica*, vol. 113, no. 3, pp. 189–198, 2006.
- [115] C. L. Gibson, B. Coomber, and S. P. Murphy, "Progesterone is neuroprotective following cerebral ischaemia in reproductively ageing female mice," *Brain*, vol. 134, no. 7, pp. 2125–2133, 2011.
- [116] T. Ishrat, I. Sayeed, F. Atif, and D. G. Stein, "Effects of progesterone administration on infarct volume and functional deficits following permanent focal cerebral ischemia in rats," *Brain Research*, vol. 1257, pp. 94–101, 2009.
- [117] M. Prencipe, C. Ferretti, A. R. Casini, M. Santini, F. Giubilei, and F. Culasso, "Stroke, disability, and dementia: results of a population survey," *Stroke*, vol. 28, no. 3, pp. 531–536, 1997.
- [118] I. Sayeed, B. Wali, and D. G. Stein, "Progesterone inhibits ischemic brain injury in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion," *Restorative Neurology and Neuroscience*, vol. 25, no. 2, pp. 151–159, 2007.
- [119] H. Lee, R. J. McKeon, and R. V. Bellamkonda, "Sustained delivery of thermostabilized chABC enhances axonal sprouting and functional recovery after spinal cord injury," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 8, pp. 3340–3345, 2010.
- [120] V. J. Tom, R. Kadakia, L. Santi, and J. D. Houllé, "Administration of chondroitinase ABC rostral or caudal to a spinal cord injury site promotes anatomical but not functional plasticity," *Journal of Neurotrauma*, vol. 26, no. 12, pp. 2323–2333, 2009.
- [121] J. J. Hill, K. Jin, X. O. Mao, L. Xie, and D. A. Greenberg, "Intracerebral chondroitinase ABC and heparan sulfate proteoglycan glypican improve outcome from chronic stroke in rats," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, no. 23, pp. 9155–9160, 2012.
- [122] S. Soleman, P. K. Yip, D. A. Duricki, and L. D. F. Moon, "Delayed treatment with chondroitinase ABC promotes sensorimotor recovery and plasticity after stroke in aged rats," *Brain*, vol. 135, no. 4, pp. 1210–1223, 2012.
- [123] B. E. Skolnick, A. I. Maas, R. K. Narayan et al., "A clinical trial of progesterone for severe traumatic brain injury," *The New England Journal of Medicine*, vol. 371, no. 26, pp. 2467–2476, 2014.
- [124] D. W. Wright, S. D. Yeatts, R. Silbergleit et al., "Very early administration of progesterone for acute traumatic brain injury," *The New England Journal of Medicine*, vol. 371, no. 26, pp. 2457–2466, 2014.
- [125] L.-H. Krarup, T. Truelsen, C. Glud et al., "Prestroke physical activity is associated with severity and long-term outcome from first-ever stroke," *Neurology*, vol. 71, no. 17, pp. 1313–1318, 2008.
- [126] P. M. Rist, I.-M. Lee, C. S. Kase, J. Michael Gaziano, and T. Kurth, "Physical activity and functional outcomes from cerebral vascular events in men," *Stroke*, vol. 42, no. 12, pp. 3352–3356, 2011.

- [127] Q. Zhang, L. Zhang, X. Yang, Y. Wan, and J. Jia, "The effects of exercise preconditioning on cerebral blood flow change and endothelin-1 expression after cerebral ischemia in rats," *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, vol. 23, no. 6, pp. 1696–1702, 2014.
- [128] M. Bernaudin, A.-S. Nedelec, D. Divoux, E. T. MacKenzie, E. Petit, and P. Schumann-Bard, "Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 22, no. 4, pp. 393–403, 2002.
- [129] D. Dornbos III, N. Zwagerman, M. Guo et al., "Preischemic exercise reduces brain damage by ameliorating metabolic disorder in ischemia/reperfusion injury," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 91, no. 6, pp. 818–827, 2013.
- [130] Y.-H. Ding, Y. Ding, J. Li, D. A. Bessert, and J. A. Rafols, "Exercise pre-conditioning strengthens brain microvascular integrity in a rat stroke model," *Neurological Research*, vol. 28, no. 2, pp. 184–189, 2006.
- [131] M. Guo, B. Cox, S. Mahale et al., "Pre-ischemic exercise reduces matrix metalloproteinase-9 expression and ameliorates blood-brain barrier dysfunction in stroke," *Neuroscience*, vol. 151, no. 2, pp. 340–351, 2008.
- [132] M. Ploughman, Z. Attwood, N. White, J. J. E. Doré, and D. Corbett, "Endurance exercise facilitates relearning of forelimb motor skill after focal ischemia," *The European Journal of Neuroscience*, vol. 25, no. 11, pp. 3453–3460, 2007.
- [133] L. L. Guyot, F. G. Diaz, M. H. O'Regan, S. McLeod, H. Park, and J. W. Phillis, "Real-time measurement of glutamate release from the ischemic penumbra of the rat cerebral cortex using a focal middle cerebral artery occlusion model," *Neuroscience Letters*, vol. 299, no. 1-2, pp. 37–40, 2001.
- [134] K. Matsumoto, R. Graf, G. Rosner, J. Taguchi, and W.-D. Heiss, "Elevation of neuroactive substances in the cortex of cats during prolonged focal ischemia," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 13, no. 4, pp. 586–594, 1993.
- [135] J. Jia, Y.-S. Hu, Y. Wu et al., "Pre-ischemic treadmill training affects glutamate and gamma aminobutyric acid levels in the striatal dialysate of a rat model of cerebral ischemia," *Life Sciences*, vol. 84, no. 15-16, pp. 505–511, 2009.
- [136] F. Zhang, J. Jia, Y. Wu, Y. Hu, and Y. Wang, "The effect of treadmill training pre-exercise on glutamate receptor expression in rats after cerebral ischemia," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 11, no. 7, pp. 2658–2669, 2010.
- [137] J. Jia, Y.-S. Hu, Y. Wu et al., "Treadmill pre-training suppresses the release of glutamate resulting from cerebral ischemia in rats," *Experimental Brain Research*, vol. 204, no. 2, pp. 173–179, 2010.
- [138] E. T. Ang, P. T. H. Wong, S. Moochhala, and Y. K. Ng, "Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors?" *Neuroscience*, vol. 118, no. 2, pp. 335–345, 2003.
- [139] A. C. Ricciardi, E. López-Cancio, N. Pérez De La Ossa et al., "Prestroke physical activity is associated with good functional outcome and arterial recanalization after stroke due to a large vessel occlusion," *Cerebrovascular Diseases*, vol. 37, no. 4, pp. 304–311, 2014.



**Hindawi**

Submit your manuscripts at  
<http://www.hindawi.com>





# Influence of Aerobic Training and Combinations of Interventions on Cognition and Neuroplasticity after Stroke

Annabelle Constans<sup>1†</sup>, Caroline Pin-barre<sup>1,2†</sup>, Jean-Jacques Temprado<sup>1</sup>, Patrick Decherchi<sup>1</sup> and Jérôme Laurin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Aix-Marseille Université, CNRS, ISM, UMR 7287, Marseille, France, <sup>2</sup> Université Nice Sophia Antipolis, LAMHES, UPRES EA 6309, Nice, France

Stroke often aggravated age-related cognitive impairments that strongly affect several aspects of quality of life. However, few studies are, to date, focused on rehabilitation strategies that could improve cognition. Among possible interventions, aerobic training is well known to enhance cardiovascular and motor functions but may also induce beneficial effects on cognitive functions. To assess the effectiveness of aerobic training on cognition, it seems necessary to know whether training promotes the neuroplasticity in brain areas involved in cognitive functions. In the present review, we first explore in both human and animal how aerobic training could improve cognition after stroke by highlighting the neuroplasticity mechanisms. Then, we address the potential effect of combinations between aerobic training with other interventions, including resistance exercises and pharmacological treatments. In addition, we postulate that classic recommendations for aerobic training need to be reconsidered to target both cognition and motor recovery because the current guidelines are only focused on cardiovascular and motor recovery. Finally, methodological limitations of training programs and cognitive function assessment are also developed in this review to clarify their effectiveness in stroke patients.

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Daniela Tropea,  
Trinity College Dublin, Ireland

### Reviewed by:

In Koo Hwang,  
Seoul National University,  
South Korea  
Ramesh Kandimalla,  
Emory University, USA

### \*Correspondence:

Jérôme Laurin  
jerome.laurin@univ-amu.fr

<sup>†</sup>These authors have equally contributed to this work and should be considered both as first authors.

**Received:** 30 May 2016

**Accepted:** 21 June 2016

**Published:** 30 June 2016

### Citation:

Constans A, Pin-Barre C, Temprado J-J, Decherchi P and Laurin J (2016) Influence of Aerobic Training and Combinations of Interventions on Cognition and Neuroplasticity after Stroke. *Front. Aging Neurosci.* 8:164. doi: 10.3389/fnagi.2016.00164

**Keywords:** aging neuroscience, stroke rehabilitation, cerebral ischemia, angiogenesis, cognitive disorders, exercise intensity, neurotrophic factors, rat and human model

## INTRODUCTION

Sedentary older adults are prone to cardiovascular diseases, such as stroke (Bherer et al., 2013), which occurs when blood flow is interrupted to a part of the brain. This trauma leads to severe motor dysfunctions and it may also aggravate cognitive impairments resulting from normal aging (Rafnsson et al., 2007, 2009; Deary et al., 2009; Waldstein and Wendell, 2010). Indeed, stroke survivors have more than twice the risk of subsequently developing dementia compared with people who have never had a stroke (Tatemichi et al., 1992; Patel et al., 2002). For instance, a stroke situated on the left hemisphere might disturb language and comprehension, which reduce the ability to communicate (Karbe et al., 1990; Pirmoradi et al., 2016). When the right hemisphere is affected, the intuitive thinking, reasoning, solving problems as well as the perception, judgment and the visual-spatial functions could be impaired (Tatemichi et al., 1994; Patel et al., 2002; Cumming et al., 2012; Sun et al., 2014b; Harris et al., 2015; Tiozzo et al., 2015; Save-Pédebos et al., 2016). It makes thus

difficult for patients to locate objects, walk up or down stairs or get dressed. Consequently, cognitive disorders are one of the strongest predictor of the inability to return to work, that contribute to the socioeconomic burden of stroke (Kauranen et al., 2013). However, stroke-induced cognitive disorders are often underestimated relative to motor impairments because they are confused with pre-existing symptoms of age-related mild cognitive impairments or Alzheimer’s Disease (AD; Figure 1; Sun et al., 2014b; Corriveau et al., 2016). Furthermore, cognitive impairments are frequently associated with poor motor recovery (Patel et al., 2002; Leśniak et al., 2008; Rand et al., 2010). It suggests that stroke-induced cognitive dysfunctions and brain plasticity might also affect the stability, flexibility and learning of complex movements (e.g., locomotion, unimanual aiming, bimanual coordination), in which cognitive resources are highly involved as it was already observed in older adults (Temprado et al., 1999, 2013; Sleimen-Malkoun et al., 2012, 2013; Cohen et al., 2016).

It is thus of great importance to find effective interventions to induce both motor and cognitive improvement after stroke. In this respect, it is now widely established that aerobic training enhances cardiorespiratory fitness, muscular endurance and functional recovery of stroke patients resulting in a higher quality of life (Ivey et al., 2005; Macko et al., 2005; Marsden et al., 2013). Over the past few years, few studies have also shown that aerobic training could improve cognitive functions and promotes neuroplasticity in stroke patients (Quaney et al., 2009;

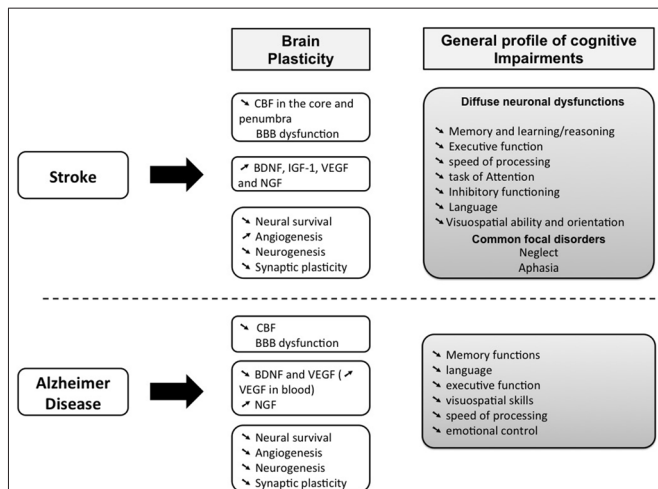
Rand et al., 2010; Wogensen et al., 2015). In support of these observations, animal studies have revealed that such training effects on cognitive functions might be partially mediated by the release of neurotrophic factors that promotes angiogenesis, neurogenesis, synaptogenesis and synthesis of neurotransmitters that could not be directly investigated at central level in humans (Churchill et al., 2002; Cotman et al., 2007; Lövdén et al., 2010). However, despite firm evidence supporting the use of aerobic exercise for stroke patients, the mechanisms underlying neuroplasticity that is at origin of cognitive and motor recovery in stroke patients remain unknown.

In the present review, we first examine how aerobic training might play a beneficial role on cognition after stroke. In particular, we highlight the influence of aerobic training on neuroplasticity in both human and animal. We also discuss whether additional rehabilitation strategies and/or pharmacological treatments could accentuate neuroplasticity and consequently, the recovery of cognitive functions. In addition, we present the different exercise parameters that should be taken into account in aerobic training, namely: intensity, duration, frequency (number of session per week) and types of exercise as well as timing of training initiation after stroke onset. Indeed, they might differ in their effectiveness to improve cognition and motor functions. Therefore, classic recommendations for aerobic exercise are reconsidered to target cognition as well as motor and cardiovascular functions. Finally, we discuss about the methodological limitations that may hamper the understanding of aerobic training effects on cognition both in human and animal studies.

## INFLUENCE OF AEROBIC TRAINING ON NEUROPLASTICITY AND COGNITIVE FUNCTIONS

Cognitive disorders (i.e., executive function and/or information processing speed), motor dysfunctions (i.e., locomotion, balance and strength impairments) and cardiorespiratory fitness weakness are frequently observed in both elderly and stroke people. However, the severity of these impairments is exacerbated due to ischemia in older stroke patients (Gordon et al., 2008; Billinger et al., 2012; Cumming et al., 2013; Harada et al., 2013). Moreover, some neural mechanisms involved in cognitive disorders appear to be close between aging and cerebral ischemia. Specifically, a decrease of neurotrophic factor release (Ang et al., 2003; Silhol et al., 2005; Chae and Kim, 2009) or an abnormal level of oxidative stress and inflammation in hippocampus have been observed in both population (Joseph et al., 2005; Wang et al., 2007). In addition, cerebral blood flow decreases in ischemic region (Cupini et al., 2001; Zhang et al., 2013a) while the reduced vessel density in aging brain leads to an overall reduced blood flow and oxygenation into the brain (Petcu et al., 2010). Therefore, promoting angiogenesis might be critical for these two populations.

In numerous studies, it was demonstrated that aerobic training could induce beneficial effects on brain plasticity and associated cognitive functions as well as motor and



**FIGURE 1 | Comparison of the main cognitive impairments between stroke patient and people with Alzheimer Disease (AD).** Both AD and cerebrovascular disease increase with age. Although the cause of stroke and AD are distinct, we can observe that the cognitive impairments can be confused because these two brain disturbances could lead to dementia. The hypothesis of vascular contributions to cognitive impairment and dementia (VCID) is that cognitive impairments result from cerebrovascular damages and thus cover the effect of AD, cerebrovascular diseases, including stroke, on cognition (Corriveau et al., 2016). It can be added that more stroke is severe, more the risk of dementia is high. Micro-infarct, silent stroke or small vessel insults are often related to mild cognitive impairments (see also McDonnell et al., 2011; Cumming et al., 2012). However, the outcomes on brain plasticity is specific to each brain disorders (Sopova et al., 2014).

cardiorespiratory functions in aging population (Patel et al., 2002; McAuley et al., 2004; Kramer and Erickson, 2007; Leśniak et al., 2008; Erickson and Kramer, 2009). Thus, it can be hypothesized that such training could lead to similar positive effects on cognitive functions in stroke patients. In the following, we present evidence supporting this hypothesis in both older adults and animal studies. Then, on the basis of the few available studies in the literature, we made an overview of the effects of aerobic training on cognitive functions in people and animal with cerebral ischemia.

## Studies on Healthy Older Adults

It is now recognized that aerobic training stimulates the positive plasticity of the aging brain. Such exercise-related plasticity mediates the maintenance, or even the increase, of cognitive performance as indicated by the improvement of executive functions and long-term memory. Such enhancements were observed in spite of the heterogeneity of methods, subject characteristics, training parameters or cognitive tasks used in the related studies (Colcombe and Kramer, 2003). Thanks to the use of sophisticated brain imaging technologies, cerebral modifications induced by aerobic training has been observed at both structural (i.e., increase in white and gray matter volumes and changes in synaptic connections) and functional (i.e., changes in brain activation patterns) levels (Churchill et al., 2002; Cotman and Berchtold, 2002; Colcombe and Kramer, 2003; Colcombe et al., 2004a,b, 2006; McAuley et al., 2004; Erickson and Kramer, 2009; Greenwood and Parasuraman, 2010; Voss et al., 2010a,b). For instance, using functional magnetic resonance imagery (fMRI), it was shown that elderly people aerobically trained displayed a higher activation of brain areas involved in attentional control and inhibitory functioning, while a reduced activation is observed in brain areas involved in behavioral conflict (Colcombe et al., 2004a). Additionally, 12-week of both bike and treadmill aerobic training increases the hippocampal and anterior cingulate cortex cerebral blood flow and also an immediate and delayed verbal memory. Such increase is closely related to neuroregeneration (Petcu et al., 2010; Chapman et al., 2013; Duzel et al., 2016). This result was recently reinforced by showing with the use of gadolinium-based perfusion imaging (3 Tesla MRI) that aerobic fitness improvement in healthy older adults is correlated with changes in hippocampal perfusion and volume that were positively related to changes in recognition memory and early recall for complex spatial objects (Maass et al., 2015).

Circulating neurotrophic factor measurements such as brain-derived neurotrophic factor (BDNF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF; see below for details) might also explain the influence of aerobic training on neuroplasticity and cognition in Human but this point remains controversial (Cotman et al., 2007). In the one hand, few studies have observed an increase in serum BDNF level in older adults after 1-year of aerobic training that was correlated with an increase in hippocampal volume and improvement in spatial memory performance as well as in executive function (Erickson et al., 2012; Leckie et al., 2014). Specifically, Leckie et al. (2014), revealed that the oldest subjects exhibited the greatest

increase in circulating BDNF levels and improvement in task performance after training. This observation suggests that age affects BDNF serum levels (Leckie et al., 2014). On the other hand, numerous studies did not provide robust evidence for enhancement of these neurotrophic factors after several weeks of training in aging people (Voss et al., 2013; Maass et al., 2015). For instance, serum BDNF, VEGF and IGF-1 level did not increase after 12-month of aerobic or non-aerobic (stretching exercises) training despite an increase of connectivity in the temporal lobe between the bilateral parahippocampus and the bilateral middle temporal gyrus (Voss et al., 2013). Recently, Maass et al. (2015), confirmed these results by showing that no difference in changes of circulating BDNF, VEGF and IGF-1 was observed after 3-month of treadmill (training group) or progressive-muscle relaxation/stretching (control group) despite an increase of hippocampal perfusion and volume (Maass et al., 2015). On the basis of these results, it was suggested that the training-related improvement of cerebral perfusion could lead to beneficial effects on neural function without any contribution of growth factors.

These contradictory findings might result from limitations associated with the circulating serum growth factor measurements and training protocols. For instance, nutritional status and changes in energy balance inducing by exercise interventions might affect growth factor levels (Monteleone et al., 2004). Moreover, as it was previously mentioned (Coelho et al., 2013), studies presented different training durations and exercise intensity and heterogeneous samples. Authors also included a different proportion of females and/or males in their studies. Such imbalance in gender composition of experimental groups could have an effect of baseline serum BDNF that might hide possible influence of aerobic training (Komulainen et al., 2008; Driscoll et al., 2012). It has also been suggested that the variable time-windows of circulating growth factor measurements and the analysis techniques used for quantifying blood growth factor levels could also affect the results and need to be clarified (Maass et al., 2015). Finally, data from circulating growth factor assessment should be interpreted with caution since no direct relationships between circulating and brain growth factor levels has been found in human. Studies on human only demonstrated that peripheral BDNF was associated with cognitive performance and cerebral structure integrity (Ventriglia et al., 2013). However, it was also established in animal model that BDNF, VEGF and IGF-1 might have the potential to cross the blood-brain barrier (BBB) in both directions in the central nervous system (CNS; Pan et al., 1998; Cotman et al., 2007). As an illustration, Karege et al. (2002), demonstrated that serum BDNF was positively correlated with cortical BDNF in rat model. In addition, blocking the peripheral IGF-1 or VEGF access to the brain impeded exercise-induced plasticity in the hippocampus (Karege et al., 2002; Cotman et al., 2007). However, other studies have shown in neurological disorders such as stroke and depression that changes in regional brain BDNF levels are not associated with changes of BDNF levels in peripheral blood (Elfvig et al., 2010; Béjot et al., 2011). To date, it thus remains difficult to clearly determine the real role of circulating growth factors on cognitive function in older subjects.

## Studies on Healthy Animals

Animal experiments could provide information about neuroplasticity mechanisms at cellular level in brain areas involved in cognitive functions. To date, three main neurotrophic factors have been identified to contribute to increase neuroplasticity after aerobic training: (i) the VEGF, which is a protein whose main role is to stimulate angiogenesis; (ii) the BDNF, which is a critical protein involved in brain plasticity. Indeed, this neurotrophin mediates numerous proteins expressions and molecular pathways, i.e., synapsin-I and synpatophysin, both involved in synaptic transmission and neurotransmitter release, C-AMP response element-binding protein (CREB) and beta calcium/calmodulinedependent kinase II ( $\beta$ -CaMKII) both contributing in long-term potentiation (LTP). BDNF thus promotes synaptic plasticity, neurogenesis and neuronal survival within the hippocampus (Vaynman et al., 2004; Cassilhas et al., 2012); and (iii) the IGF-1, which is a peptide that crosses the BBB and stimulates neurogenesis and angiogenesis. These growth factors act together to promote training-related benefits in brain plasticity and associated cognitive functions.

It was found in adult rats that aerobic training induced-angiogenesis is associated with an increase in brain VEGF mRNA and protein (Ding et al., 2006; Cotman et al., 2007). Moreover, Swain et al. (2003), have proved that prolonged voluntary exercise induced an increase of blood volume in the motor cortex of 19% greater than control animals (Swain et al., 2003). Angiogenesis needs to be promoted because some animal studies have suggested that angiogenesis was closely linked to adult neurogenesis and other neuroplasticity mechanisms (Pereira et al., 2007).

It was demonstrated that 8-week of aerobic training on treadmill induced an improvement in learning speed and spatial learning. Authors suggested that these results could be explained by an increase of hippocampal BDNF and IGF-1 and more precisely by the activation of BDNF/TrkB/ $\beta$ -CaMKII pathway and to a lesser extent to IGF-1/IGF-1R/Akt (also known as protein kinase B) pathway (Cassilhas et al., 2012). Radák et al. (2001, 2006) indicated that short- and long-term memory was improved after 8 weeks of regular swimming exercise in middle-aged rats (14-month-old). BDNF and nerve growth factor (NGF) expressions were up-regulated as well as a reduction of accumulation of reactive carbonyl derivatives that are known to damage proteins, nucleic acids and lipids (Radák et al., 2001, 2006). Similarly, one study on aging rat model, induced by D-galactose injection, has shown that 8-week of moderate aerobic training treadmill could importantly increase both level of NGF and his receptor, the tyrosine kinase A (TrkA) in the hippocampus. NGF/TrkA activates the phosphoinositide 3-kinase (PI3-K)/Akt pathway that decreases apoptosis (Wiesmann and de Vos, 2001; Chae and Kim, 2009). Excessive reactive oxygen species (ROS) production can also trigger apoptosis in brain areas such as the hippocampus that contribute to neurodegenerative disorders and cognitive function impairments in aging people. However, moderate intensity training on treadmill (18 m/min, 30 min/day during 15 weeks) in middle-age female rats (12-month-old) could enhance antioxidant defense system and thus induced a

neuroprotective effect in the hippocampus (Marosi et al., 2012). Training also facilitated the release of metabolic proteins in the hippocampus such as mitochondrial precursor of ornithine aminotransferase and isocitrate dehydrogenase subunit alpha. However, these results remain difficult to interpret because authors suggested that alteration of mitochondrial proteins may be either reflecting mitochondrial damage or adaptation to mitochondrial dysfunction (Kirchner et al., 2008).

## Studies on Stroke Patients

Only three studies investigated the role of aerobic training on cognition in stroke patients (Table 1). Two of them indicated that aerobic training might reduce cognitive disorders by improving functional outcomes as well as motor learning by the increase of information processing speed and implicit memory while executive functions remain affected (Quaney et al., 2009; El-Tamawy et al., 2014). However, patients did not preserve long-term beneficial effects 8 weeks after the end of aerobic training (Quaney et al., 2009). Contrary to what was observed in healthy subject, an acute and short aerobic exercise on treadmill (20 min; 70% of the heart rate reserve) did not induce cognitive improvement in stroke patient while a slightly improvement of the movement of upper-extremity was observed (Ploughman et al., 2008).

## Studies on Animal with Cerebral Ischemia

Consistent with healthy older animals, neuroplasticity can be partially promoted by aerobic training through up-regulation of the expression of BDNF, synapsin-I and post-synaptic density protein 95 (PSD-95), also involved in LTP within hippocampus (dentate gyrus, CA1 and CA3 areas) and by increase of both CREB phosphorylation and newborn cell survival (Luo et al., 2007; Shih et al., 2013). The beneficial effect of training was reinforced when the activation of the high affinity BDNF receptor, the TrkB, was blocked because the function of BDNF was reduced and the exercise-induced spatial learning enhancement was impeded (Griesbach et al., 2009). Thus, consistent with data collected within aging rodents, it is supposed that BDNF-mediated pathway contributed to explain the improvement of spatial memory performances after cerebral ischemia. Furthermore, spatial memory performances were positively correlated with an increase of both newborn cell survival in bilateral dentate gyrus and restored microtubule-associated protein 2 (MAP2) density after cerebral ischemia (Luo et al., 2007; Shimada et al., 2013). Treadmill training might also protect against cognitive impairments in rats with bilateral common carotid artery occlusion (CCAO) by reducing the lipoperoxidation in the hippocampus through an increase of antioxidant capacity and by improving the acquisition of a spatial task as well as the performance for both retention and working memory (Figure 2; Cechetti et al., 2012). In addition, few weeks of treadmill training in rat with cerebral ischemia increases the VEGF, and its regulatory protein, caveolin-1, and improves the cerebral blood flow in ischemic region (Zhang et al., 2013a; Gao et al., 2014). However, no study has directly shown that vascular changes could contribute to explaining the cognitive disorders.



**TABLE 1 | Summary of aerobic training protocols with or without combination (pharmacological agents or other types of exercise) and their effects on cognition in stroke patient.**

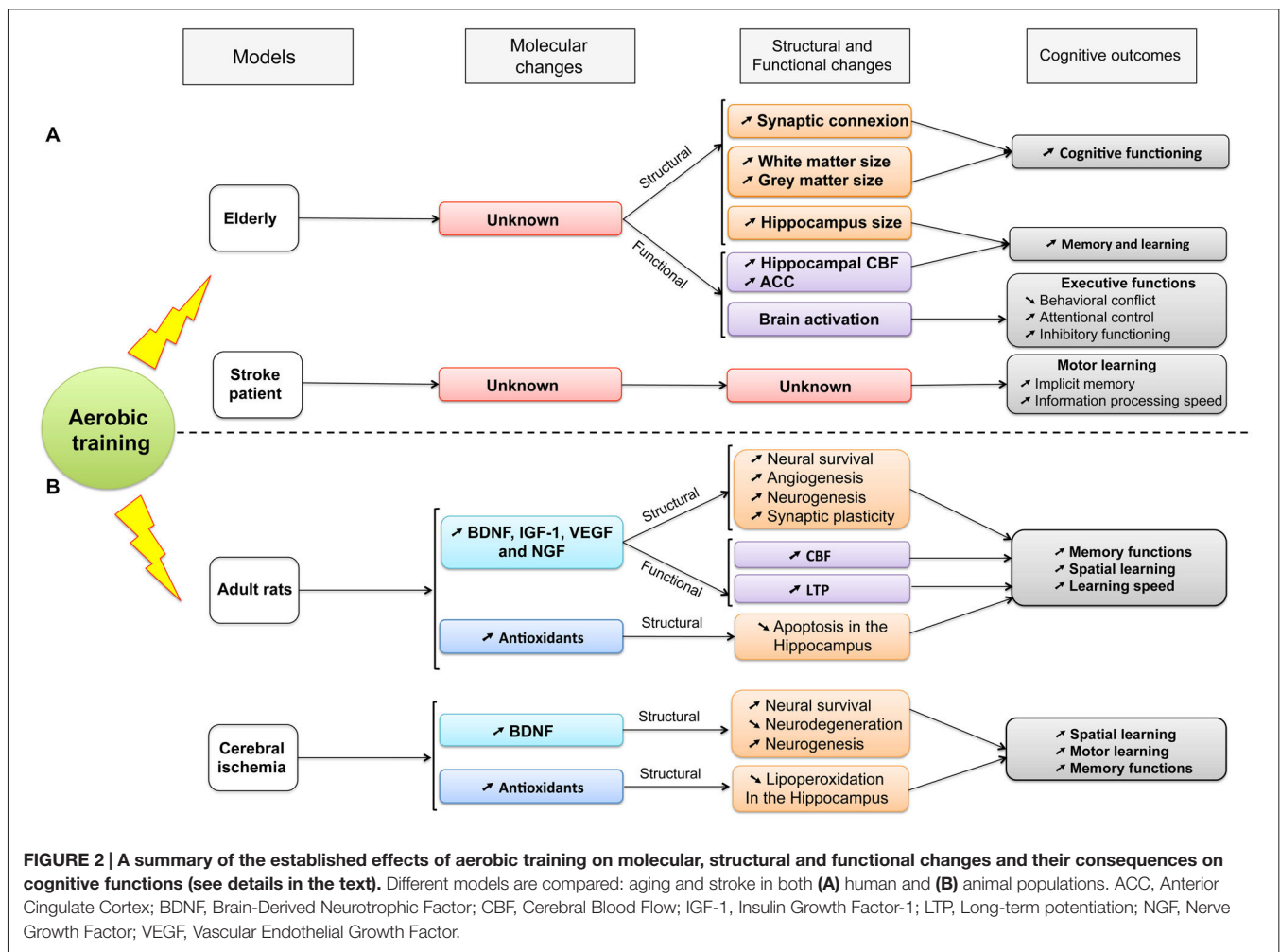
Studies	Participants	Aerobic training	Combination	Cognitive assessments	Results
Ploughman et al. (2008)	$n = 21$ ; ( $61.4 \pm 10.2$ years old); 6 months to 5 years post-stroke.	- AEX: single bout of 20 min on BWSTT at 70% of THR or 13 on The Borg RPE Scale. - Control condition: 20 min review of home exercises.	none	- TMT-A and B - Symbol digit substitution test - Paced auditory serial addition test	No significant improvement observed No relationship between exercise intensity and cognitive tests.
Quaney et al. (2009)	$n = 38$ ( $58.96 \pm 14.68$ and $64.10 \pm 12.30$ years old); > 6 months post-stroke.	- AEX: 45 min on cyclo-ergometer 3 times/week for 8 weeks at 70% HRmax ( $n = 19$ ). - Control group: Upper- and lower-extremities stretching activities 45 min on cyclo-ergometer 3 times/week for 8 weeks at home ( $n = 19$ ).	none	- WCST - Stroop task - TMT-A and B - SRTT test - PGFM	↗ $VO_{2peak}$ ↗ Complex motor learning tasks No significant improvement observed of executive function measures
Rand et al. (2010)	$n = 11$ ( $67 \pm 10.8$ years old); > 4 years post-stroke.	AEX: 1 h composed of stretching, balance, task specific exercises and 20 min of moderate exercise on The Borg RPE Scale (somewhat hard), 2 times/week for 6 months.	1 h of recreation time, 2 times/week for 6 months.	- Digit backwards - TMT - RAVLT - WWT - Digit symbol - Stroop test	↗ Dual task, response inhibition and memory at 3 months ↗ Executive functions ↗ Response inhibition at 6 months ↗ $VO_2$ max at 3 and 6 months
Kluding et al. (2011)	$n = 9$ ( $63.7 \pm 9.1$ years old); > 6 months post-stroke.	AEX: 1 h on TBRS, 3 times/week for 12 weeks.	Lower extremity muscle strengthening exercises: 1 h, 3 times/week for 12 weeks.	- Digit span backwards task - Flanker test - Memory component of the SIS	↗ Digit span backwards task ↗ SIS total score (including memory subscale) Significant relationship between improvement of aerobic and Flanker tests

(Continued)

TABLE 1 | (Continued).

Studies	Participants	Aerobic training	Combination	Cognitive assessments	Results
Marzolini et al. (2013)	n = 41 (63.6 ± 13.5 years old); 10 weeks post-stroke (74 ± 135 days).	AEX: treadmill or cyclo-ergometer depending on patient ability, 20–60 min, 5 times/week for 6 months at 40–70% of HRR or VO <sub>2peak</sub> . HR achieved at the ATge and/or 11–6 on the RPE of the Borg Scale. Intensity was progressively increased.	Resistance training during 6 months: - 50% to 60% of 1RM for non-affected limb; - ≥ 50% of 1RM and/or 13–14 RPE on the last repetition on the affected limb. - Intensity from 10–15 repetitions.	MoCA (7 different cognitive domains): - Visuo-spatial and executive function - Attention and concentration - Language - Delayed recall - Orientation - Abstraction - Naming	<ul style="list-style-type: none"> <li>↗ VO<sub>2peak</sub></li> <li>↗ VO<sub>2</sub> at the ATge</li> <li>↗ Upper- and lower-muscular strength</li> <li>↗ Attention and concentration</li> <li>↗ Visuo-spatial and executive function</li> </ul>
El-Tamawy et al. (2014)	n = 30 (49.67 ± 6.98 and 48.4 ± 6.39 years old); 3–18 months post-stroke.	AEX: 30 min, 3 times/week for 8 weeks of physiotherapy program + 45 min cyclo-ergometer Control group: 30 min, 3 times/week for 8 weeks of physiotherapy program	none	- ACER test	<ul style="list-style-type: none"> <li>↗ serum BDNF level</li> <li>↗ ACER for AEX group</li> <li>Significant correlation between changes in serum BDNF level and in ACER test</li> </ul>
Bartolo et al. (2015)	n = 47 (64.5–67 years old); Within the previous 2 weeks post-stroke.	L-deprenyl (n = 23) Placebo group (n = 24) Both groups: 1 h of physiotherapy (6 days/week) + 30 min of cyclo/arm-ergometer training (5 days/week) + 1 h of occupational therapy (3 days/week) during 6 weeks.	L-deprenyl: 10 mg/day once day during 6 weeks.	- TMT-A and B - MoCA and RAVLT - Logical memory - Digit Span - Corsi's test - Attentive matrices - Stroop test - Symbol digit - PM-47 and FAB - Phonological fluency - Semantic fluency	<ul style="list-style-type: none"> <li>↗ Logical memory</li> <li>↗ Attentive matrices</li> <li>↗ TMT-A and B</li> <li>↗ PM-47</li> <li>↗ MoCA</li> <li>↗ Digit Span</li> <li>↗ Stroop test</li> </ul>

↗ indicate an increase, ↘ a decrease respectively; BWSTT: Body-Weight-Supported Treadmill Training; THR: Target Heart Rates; RPE: Rating of Perceived Exertion; TMT: Trail making tests parts A and B; AEX: Aerobic Exercise; HRR: Heart Rate Reserve; HRmax: Heart Rate Maximal; WCST: Wisconsin Card Sorting test; SRTT: Serial Reaction Time Task; PGFM: Predictive Grip Force Modulation; RAVLT: Rey Auditory Verbal Learning Test; WWT: Walking While Talking; SIS: Stroke Impact Scale; ATge: Gas Exchange Anaerobic threshold; ACER: Addenbrooke's cognitive examination-revised; TBRS: Total Body Recumbent Stepper; MoCA: Montreal Cognitive Assessment ; PM-47: Raven's Coloured Progressive Matrices 47; FAB: Frontal Assessment Battery; BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor.



## IS THE COMBINATION OF AEROBIC TRAINING WITH OTHER TYPES OF THERAPIES EFFECTIVE FOR IMPROVING COGNITION RECOVERY AFTER STROKE?

### Combination with Other Rehabilitation Exercises

The question arises of whether different types of exercise could be combined to improve the effects that they could have separately. As reviewed by Chang et al. (2012), resistance exercise alone could positively impact selective cognitive functions in older adult such as information-processing speed, attention and several aspects of memory and executive functions (Chang et al., 2012). It was postulated that the main potential underlying mechanism for these benefits is based on resistance training-induced IGF-1 both in brain and blood circulation. Moreover, growing evidence have shown that the combination of aerobic and resistance training induced superior beneficial effect on cognition than aerobic exercise alone in aging population (Colcombe and Kramer, 2003). In this way, the association between resistance and aerobic training might be a potential strategy to further facilitate the

cognitive function recovery in stroke population. However, few studies have been conducted to test this attractive hypothesis (Rand et al., 2010; Kluding et al., 2011; Marzolini et al., 2013). Results indicated that combination of aerobic training and lower extremity muscle strengthening improved executive functions, attention and voluntary motor control (Kluding et al., 2011). This is consistent with the study carried out by Marzolini et al. (2013), in which 6 months of both aerobic training at moderate intensity associated with resistance exercises induced improvements in the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) scores in subdomain of attention/concentration and visuospatial/executive functioning (Marzolini et al., 2013). Another study on chronic stroke patients combining aerobic training with stretching, balance and task-specific exercises as well as sessions of recreation time has shown an improvement in verbal memory and cognitive flexibility but did not promote executive function (Rand et al., 2010). However, since the isolated effects of resistance and aerobic training were not compared with the combination of both of them, it remains difficult to ensure that such combination induces superior beneficial effects on cognition than aerobic intervention alone after stroke. It should also be noticed that the neuroplasticity associated with cognition

recovery after combination of aerobic and other rehabilitation strategies has not been investigated in both human and animal stroke studies.

## Combination of Aerobic Training with Pharmacological Treatments

Currently, both aerobic and behavioral training have been shown to improve cognition on stroke patient but it remains insufficient to induce total recovery (Quaney et al., 2009; Cherry et al., 2014). Thus, it seems crucial to find new strategy combinations including aerobic exercise to amplify the effects on cognition. Many pharmacological treatments are possible candidates to improve cognitive function after stroke by stimulating brain plasticity. For instance, the drug memantine, used for the treatment of moderate to severe dementia of the Alzheimer's type, could increase synaptic plasticity and LTP and decrease overactivation of N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptors (NMDA-r) in order to limit excitotoxic neuronal death (Martin and Wang, 2010; Berthier et al., 2011). Other substances, like citicoline, an intermediate in the generation of phosphatidylcholine from choline, could increase the level of acetylcholine and dopamine as well as decrease infarct volume in animal model with cerebral ischemia (Alvarez-Sabín and Román, 2011).

To date, only the intravenous (IV) recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) was approved by the USA Food and Drug Administration for the treatment of acute ischemic stroke in human (Marshall, 2015). The rt-PA is focused on thrombolytic events and could reduce the infarct volume (Nys et al., 2006) by restoring cerebral blood flow and oxygen supply to ischemic brain tissue (Thompson and Ronaldson, 2014). When rt-PA is administered within the first 3 h after stroke, it could improve clinical outcomes and activities of daily life from 3, 6 and 12 months (Kwiatkowski et al., 1999; Nys et al., 2006; Murao et al., 2014). However, the effects of rt-PA administration during the first 24 h on cognitive functions are limited to aphasia that is explained by the reperfusion of language areas (only for one-third of patient; Nys et al., 2006; Hajjar et al., 2013; Kremer et al., 2013). Only one study used rt-PA in combination with physical activity during leisure-time. Results showed that combination of the 2 strategies did not accentuate the cognitive and physical improvements compared to rt-PA alone after 3 months (Decourcelle et al., 2015).

In preclinical study, L-deprenyl is a pharmacological treatment used to decrease ROS known to contribute to neuronal cell death in the ischemic core following permanent middle cerebral artery occlusion in mice (Unal et al., 2001). This substance has already shown the clinical effectiveness on cognitive functions in the elderly human with AD (Wilcock et al., 2002). L-deprenyl generates an amphetamine-like effect by acting on the release of dopamine and hampering its reuptake that contribute to the modulation of both attention and executive functions (Table 1; Bartolo et al., 2015). After stroke, combination of both L-deprenyl and standard rehabilitation including physiotherapy, cycle arm-ergometer training and occupational therapy during 6 weeks showed an improvement

of logical memory, visual selective attention and non-verbal reasoning (Bartolo et al., 2015). However, this study did not compare the effect of such combination with the L-deprenyl treatment effect or the standard rehabilitation alone. Therefore, it remains difficult to postulate that the combination of these two strategies reinforced the cognitive recovery. In rat model, D-amphetamine administration combined to locomotor training enhances locomotor recovery after cortical injury (Feeney et al., 1982; Ramic et al., 2006). Moreover, other study assessed the effect of D-amphetamine administration combined with functional rehabilitation and physical therapy alone on cognitive memory performance and motor recovery after embolic stroke. Results showed that D-amphetamine with functional rehabilitation was more effective to improve cognitive performance than training alone, especially for memory, but the latter could improve fine motor performance (Rasmussen et al., 2006). By contrast, it was found in stroke patient that the combination of unique training session of—lower-extremity stability platform task, upper-extremity simulated feeding task and declarative learning—with D-cycloserine treatment did not accentuate the effect of motor and cognitive training (Cherry et al., 2014). This agent is already known to improve both motor and cognitive functions through increasing LTP in the hippocampus by regulating NMDA-r (Yaka et al., 2007). Cherry et al. (2014) postulated that an unique training session is not enough to amplify pharmacological treatment and that D-cycloserine could not act on the reduced NMDA-r function, and thus, on the motor task learning after stroke.

Finally, the review of literature suggests that no efficient combination between pharmacological treatments and training has yet found to improve recovery on cognitive functions. However, several combinations of pharmacological treatments and aerobic training have proven effectiveness on motor recovery after cerebral ischemia (Pin-Barre and Laurin, 2015). For example, the combination of both S-nitrosoglutathione and training accentuated neuroplasticity (reduce excitotoxicity, inflammation and protect BBB integrity) and motor recovery (Sakakima et al., 2012). Future studies should investigate the effects of these types of associations on cognitive recovery.

## MOTOR VS. COGNITIVE FUNCTION RECOVERY: CAN AEROBIC TRAINING SIMILARLY FACILITATE BOTH?

Currently, the recommendations for the use of aerobic training after stroke were only established according to the effectiveness of endurance programs on cardiovascular and motor functions (Pang et al., 2013; Billinger et al., 2014). The cognitive outcomes are thus not taken into account for prescribing physical exercise. However, several findings arising from rodent studies indicate that the most appropriate intensity, the optimal timing to initiate training and the exercise mode (type of exercise) for improving motor performance might be different to improve cognitive function and motor recovery.

## Cognitive Performance Improvement by Aerobic Training

### Exercise Intensity

Low-intensity aerobic training seems to be more effective than high-intensity training to promote cognitive health. Indeed, animal studies have shown that low-intensity training induced superior positive effects on spatial learning task in a water maze test and on both object recognition and location tasks than intense training (Shih et al., 2013; Shimada et al., 2013). Such cognitive task improvements were concomitant with an increase in plasticity-related proteins such as the increase of hippocampal BDNF level, synapsin-I as well as the number of dendritic spines and the number of neurons in the ipsilateral dentate gyrus (Shen et al., 2013; Shih et al., 2013; Shimada et al., 2013). It was mainly explained by the fact that, compared to low-intensity exercise, the high-intensity exercise induced higher levels of stress-hormone, which might downregulate BDNF level in hippocampus (Schaaf et al., 1999; Soya et al., 2007). Nevertheless, caution is required concerning the chosen running intensity. Indeed, the speed, fixed to 20–22 m/min, was considered as “high” intensity in Shih and Shimada’s studies (Shih et al., 2013; Shimada et al., 2013) while others have classified such range of speed as moderate intensity (Sun et al., 2008; Ni et al., 2012). Therefore, the real influence of exercise intensity based on physiological parameters (for example, lactate threshold or  $VO_{2peak}$ ) on cognitive recovery remains to be further investigated (see “Methodological Considerations” Section).

### Timing of Training Initiation

Late exercise, beginning after the first week post-brain injury, is more effective than early exercise (starting during the first week) to improve cognitive functions. Indeed, spatial learning and retention were better improved with the late training and was associated with the upregulation of BDNF (Griesbach et al., 2004; Clark et al., 2008). Voluntary running wheel training, starting 1 week after transient focal cerebral ischemia in mice, promoted neurogenesis in the adult dentate gyrus and spatial memory rebuilding (Luo et al., 2007). Interestingly, the Schmidt meta-analysis indicated that a start of skilled forelimb training from days 1 to 5 post-injury was more effective to improve cognitive function compared to late training (Bland et al., 2000; Wurm et al., 2007; Schmidt et al., 2014). It might be suggested that motor skilled training might start before aerobic training to improve cognitive functions.

### Forced vs. Voluntary Training

The training mode might also influence the neuroplasticity underlying cognitive performance. Some studies have recently demonstrated that involuntary exercise (functional electrical stimulation), forced (treadmill) and voluntary (running wheel) training have similar beneficial effects on cognitive function after cerebral ischemia as indicated by improvement of both object recognition and location tests (Lin et al., 2015). Moreover, these three training regimens enhanced the levels of synapsin I, synaptophysin, PSD-95, MAP-2 and Tau protein in the hippocampus. It was confirmed by a previous study on

healthy rats where 6 weeks of forced swimming or voluntary running resulted in similar increase of hippocampal BDNF level and in similar effect on learning capabilities and short/long term memories (Alomari et al., 2013). Nevertheless, other studies indicated divergent results. On one side, Hayes et al. (2008), demonstrated that, after 2-h of middle cerebral artery occlusion, forced treadmill training reduced infarct volume and increased the gene expression of heat shock proteins (Hsp), in particular the 27 kDa Hsp and the 70 kDa Hsp mRNA than voluntary exercise despite higher corticosterone level. The Hsp acts in the brain as molecular chaperones with neuroprotective activities (Hayes et al., 2008). Other authors indicated that 12 weeks of forced treadmill training could protect against cognitive and biochemical impairments caused by CCAO in rat (Cechetti et al., 2012). Similar results were found after whole-brain irradiation where forced running training reduced the neurocognitive deficits but also the hippocampal neurogenesis impairments, i.e., the down-regulation of BDNF-mediated pathway (including TrkB receptors, Akt and CREB, for example; Ji et al., 2014). On other side, some authors indicated that voluntary exercise is the most effective training in up-regulating the hippocampal BDNF level (Luo et al., 2007; Ke et al., 2011). Indeed, Ke et al. (2011), compared the effect of voluntary, involuntary and forced training after cerebral ischemia in rat. Results indicated that 7-day intervention of voluntary training induced higher level of BDNF in the hippocampus than the other modes (Ke et al., 2011). Such divergent results might be attributable to variable experimental designs.

## Motor Performance Improvement by Aerobic Training

### Exercise Intensity

To date, post-stroke guidelines recommend moderate-intensity continuous aerobic training to improve aerobic capacity and motor recovery (40–80% of the maximum heart rate reserve; 3–5 sessions/week; 20–60 min/session). However, it was demonstrated that high-intensity exercise could improve aerobic fitness by increasing the peak oxygen uptake ( $VO_{2peak}$ ) and 6-min walk performances, that remained higher 1 year after the end of training compared with baseline value (Globas et al., 2012). In addition, it has been found that the high-intensity interval training (HIT) could promote superior beneficial cardiovascular and muscular adaptations among persons with different cardiorespiratory disorders (Rognmo et al., 2004; Wisløff et al., 2007). HIT is defined as repeated series of brief and intense exercise separated by active or passive rest periods. This type of intense training is also well known to be a time-efficient strategy to promote metabolic adaptations because the total session duration is strongly reduced compared to traditional moderate-intensity continuous aerobic training (Sun et al., 2014b). Such finding is important given that “lack of time” remains the most cited barrier to regular aerobic exercise participation.

It was observed that HIT is well accepted for ambulatory chronic stroke and could induce encouraging improvements of

quality of life as observed by improvements of  $VO_{2peak}$  and work economy (Gjellesvik et al., 2012; Boyne et al., 2013; Mattlage et al., 2013). Recently, only one study has compared HIT (series of 30 s at maximum tolerated treadmill speed separated by 30–60 s rest periods) and traditional moderate-intensity continuous aerobic training (Boyne et al., 2016). Authors indicated that no clear difference between HIT and moderate-intensity continuous aerobic training was observed because of a small sample size. Nevertheless, this type of training seems to be feasible and safe because no adverse events occurred.

### Timing of Training Initiation

It was postulated in human studies that starting rehabilitation program in the acute-subacute phase after stroke could prevent complications relating to prolonged inactivity (i.e., deconditioning period) and presented a low relative risk for adverse effects (Musicco et al., 2003). Numerous studies in rodents with cerebral ischemia have also observed that an early starting aerobic exercise (from days 1 to 5) was more effective to improve the running performance and to reduce the infarct volume compared to late training (Bland et al., 2000; Luo et al., 2007; Schmidt et al., 2014). For example, Park et al. (2010), indicated that early treadmill training could better improve the motor performance, using the Rotarod test, than late treadmill training after hemorrhagic stroke (Park et al., 2010). Such early training did not increase the infarct volume or brain edema in accordance to other studies (Matsuda et al., 2011; Zhang et al., 2013b). Likewise, an early treadmill exercise increased the cellular expression levels of some neurotrophic factors, promoted cell growth and reduced the expression of apoptosis markers (Mizutani et al., 2010; Matsuda et al., 2011). Moreover, an early endurance exercise improved blood flow in the ischemic region and promoted angiogenesis (Zhang et al., 2013b). We may also add that sensorimotor deficits and cortical infarct volume were aggravated on a longer-term when training started too soon i.e., before 24 h post-ischemia (Kozłowski et al., 1996; Risedal et al., 1999; Bland et al., 2000; DeBow et al., 2004; Schmidt et al., 2014).

### Forced vs. Voluntary Training

Numerous studies highlighted that forced treadmill training is more effective than all the other types of exercise, included voluntary exercise, to improve running function, aerobic fitness and to reduce infarct volume (Takamatsu et al., 2010, 2016; Schmidt et al., 2014). However, some authors indicated that voluntary exercise is more effective to improve motor recovery using the De Ryck's behavioral test (Ke et al., 2011). These controversial results might be explained by the use of different motor behavioral tests between studies as well as by a different training protocol (variable speed and timing of training initiation).

### Concomitant Improvement of Cognitive and Motor Functions Induced by Aerobic Exercise

Interestingly, Sun et al. (2014), might find a compromise in rats by proving that training with gradually increased intensity on treadmill (from 5 to 26 m/min) could better improve motor

function and produce higher hippocampal BDNF with lower stress compared to both stably low and high intensity training (Sun et al., 2014a). These results were in accordance with Zhang et al. (2012), study in which both motor performance (forelimb placing, stepping coordination) and spatial memory in rats with middle cerebral artery occlusion-reperfusion were improved after progressive intensity aerobic training (Zhang et al., 2012).

On the basis of these findings, it appears that training might alternate between high- and low-intensity sessions or might progressively reach high-intensity to accentuate improvement of either cognitive or motor performance. It also suggested that treadmill training might be appropriate for improving these two functions. However, it is more difficult to find a compromise for the timing of training initiation. Indeed, an early training seems to be more appropriate to promote motor recovery while cognitive performances were improved when aerobic training started later. Therefore, the influence of aerobic training on cognitive deficits might be considered to complete the actual exercise recommendations.

## METHODOLOGICAL CONSIDERATIONS

Although it is currently admitted that aerobic training positively affects neuro-cognitive impairments, available studies reveal a great heterogeneity in the methods used and for some, weaknesses, which make results difficult to compare (Cumming et al., 2012). These methodological limitations, which are either specific or common to human and animal models, need to be considered before interpreting results.

### Methodological Considerations Concerning Exercise Parameters in both Animal and Human Studies

Available studies strongly differ in the parameters related to exercise during aerobic training: duration, intensity, frequency, mode and timing of rehabilitation initiation. In particular, exercise intensity, which is a critical parameter of aerobic training effectiveness, deserves to be questioned (Pin-Barre and Laurin, 2015). For both human and animal models, intensity is frequently based on empirical speed/power (Ploughman et al., 2008; Kluding et al., 2011; Pählman et al., 2012; Shih et al., 2013; Shimada et al., 2013). In some human studies, the intensity was determined from subjective parameters such as level of exertion perceived by the patient (Ploughman et al., 2008; Kluding et al., 2011; Pählman et al., 2012). In these conditions, exercise intensity (moderate, intense and severe) could not be precisely determined because no physiological markers were recorded (Xu and Rhodes, 1999). Therefore, a given absolute intensity was considered as moderate for some authors but as severe for others. When training intensity was based on physiological markers, percentages of maximal heart rate or the maximal oxygen uptake ( $VO_{2peak}$ ) were the most frequently used parameters (Ploughman et al., 2008; Quaney et al., 2009; Kluding et al., 2011; El-Tamawy et al., 2014). However, these methods are insufficiently reliable

to distinguish between high and moderate training intensities. Indeed, patients barely reach their maximal aerobic capabilities during an incremental test. Recently, submaximal parameters such as ventilatory or lactic threshold have been recognized to be more suitable than  $VO_{2peak}$  to induce a higher inter-individual reproducibility in physiological response to exercise (Faude et al., 2009; Marzolini et al., 2013; Bosch et al., 2015). It is noticeable however that there is no consensus on the methods used to measure these physiological parameters from an incremental exercise test (Bentley et al., 2007). Indeed, depending on the type of incremental test, the performance and the related physiological parameters could be altered. The chosen ergometer (ergocycle or treadmill), stage duration as well as the magnitude of intensity increment between each stage are known to affect the performance (for review see, Bentley et al., 2007). Moreover, the progressive increase of exercise intensity on treadmill could be induced either by an elevation of speed (m/s) and/or inclination (percentage). The speed increment is not systematically reported in literature but some authors indicated that the grade increment was increased of 2% every 2 min with a constant (high) walking speed (Voss et al., 2013). Increase in the slope of the treadmill needs to be considered to improve the validity and the relevance of the chosen incremental test on treadmill for aging subjects. Indeed, the increment of treadmill inclination seems to be more appropriate for aging people and/or for the individuals for whom running is impossible or difficult. For instance, a lower running/walking speed on treadmill could reduce the perceived exertion of the exercise for some individuals and thus might reach highest intensities (Ehlen et al., 2011). Moreover, it was reported on obese persons that faster walking speeds might increase the risk of musculoskeletal injuries because of higher reaction forces and loading rates (Ehlen et al., 2011) in lower extremities tendons, joints and ligaments (Puga et al., 2012). Finally, most authors frequently used a stationary cycle ergometer for aging people (Maass et al., 2015) because measurements of physiological parameters during the test are more stable using this device compared to treadmill. The risk of falls is also lower on cycle ergometer. For the rodent model, some studies have proposed different treadmill protocol in order to reach the highest  $VO_{2peak}$  by modifying the treadmill inclination. It has been found in both rats and mice that the highest  $VO_{2peak}$  was reached at 25° because a distinct leveling-off of  $VO_2$  was mainly observed at this inclination (Wisløff et al., 2001; Kemi et al., 2002).

In addition, among different studies, intensities are rarely individualized, especially in rodents, while training individualization is one of the most important recommendations of stroke rehabilitation (Pang et al., 2013; Schmidt et al., 2014). This limitation might attenuate the “real” effectiveness of aerobic training. Finally, it is commonly considered in exercise physiology studies that energy expenditure needs to be equivalent between exercise types in order to compare the different effects of a specific training parameter (such as intensity or duration). In this way, all the experimental groups have the same energy expenditure and thus only the influence of a tested exercise parameter is assessed (Rognmo et al., 2004; Wisløff

et al., 2007). However, it has never been applied in animal as well as in human stroke studies.

## Specific Methodological Considerations in Human

Inter-individual differences in cerebral ischemia location and/or aerobic fitness level may affect, positively or negatively, cognitive impairments. However, they remain difficult to counteract (Tang et al., 2013; Sun et al., 2014b). For example, it was found that patients with infarction located within cortical regions, middle cerebral artery territory and/or on left hemisphere were more prone to cognitive impairments (Sun et al., 2014b).

Otherwise, using a cognitive test that did not detect the specific cognitive impairments of a patient might hide some potential effect of a training intervention (McDonnell et al., 2011; Cumming et al., 2012). For instance, cognitive measurements are frequently limited to clinical tests, as functional independence measures (FIM), that are not enough sensitive. Likewise, mini-mental state examination (MMSE) may underestimate stroke-related cognitive deficits because it presents a lack of sensitivity for identifying disorders of visual perception and of high-order executive functions (Nys et al., 2006; Pendlebury et al., 2010; Cumming et al., 2012). This might be problematic given that these latter cognitive functions are frequently affected by stroke (Sun et al., 2014b; Tiozzo et al., 2015). In this respect, the MoCA can assess numerous cognitive impairments such as executive function, attention and delayed recall disorders that appear to be more suitable for stroke patient (Pendlebury et al., 2010). Some studies have also used specific neuropsychological tests such as Trail-making part A and B, Symbol digit test, Stroop test, Digit backward test, which allow to better detect cognitive deficits induced by stroke (Ploughman et al., 2008; Quaney et al., 2009; Rand et al., 2010; Kluding et al., 2011).

To ensure that cognitive performance improvements are related to aerobic training effectiveness, an increase of aerobic fitness needs to be observed at the end of the intervention. However, change in cardiorespiratory fitness after aerobic training is not systematically reported in the different studies. Thus, caution is often required when it is claimed that cognitive improvements are associated with aerobic training rather than other interventions or environmental factors.

The issue of cognitive-motor interactions in stroke patients also deserves to be considered. Indeed, cognitive and motor processes are classically considered as functionally independent and then, explored separately in the literature. However, the control and learning of complex goal-directed movements require a close cooperation between sensorimotor control processes and higher cognitive functions. This is even more marked in older adults, for which cognitive and motor processes become less differentiated by virtue of functional reorganization of brain activation patterns. Thus, change in cognitive-motor interplay expresses an important facet of age-related intrinsic plasticity of brain and cognition. Strategic variations might be thus analyzed to assess behavioral adaptability in cognitive (Lemaire and Hinault, 2014) and sensorimotor tasks (Poletti et al., 2015, 2016).

## Specific Methodological Considerations in Animal Models

Animal experiments can provide information about underlying mechanisms of neuroplasticity that could not be investigated in human. However, several drawbacks are often observed in some studies. For instance, it is impossible to investigate the large range of cognitive functions identified in human, such as verbal learning and memory for example (Voss et al., 2013). Cognitive dysfunctions after cerebral ischemia are limited to spatial and working memory, recognition and motor learning skills (Morris water maze, passive avoidance test, object recognition or location test; Luo et al., 2007; Griesbach et al., 2009; Cechetti et al., 2012; Shih et al., 2013; Shimada et al., 2013).

In addition, exercise-induced neuroplasticity are mainly explored within hippocampus (CA1 and CA3 areas and dentate gyrus), which is related to memory and learning (Vaynman et al., 2003). However, other areas such as basal ganglia, prefrontal cortex, thalamus and cerebellum are also involved in learning and memory processes, executive functions and motor control (Graybiel, 1995; Doya, 2000; Johnson and Ojemann, 2000). Except the hippocampus, other regions, remote away from the lesion zone, are connected to the affected structures and thus might also be disturbed after stroke (i.e., diaschisis effect and synaptic inhibition). For example, inflammatory responses could be observed within thalamus or substantia nigra after cortical brain injury that might partially contribute to explain the cognitive deficits (Block et al., 2005). It could be relevant to investigate the effect of aerobic training on the cognitive functions of these cerebral areas (Carmichael et al., 2004).

## CONCLUSION

This present article provides an overview of the positive effect of aerobic training on cognitive functions. It seems that training could increase the release of the same neurotrophic

## REFERENCES

- Alomari, M. A., Khabour, O. F., Alzoubi, K. H., and Alzubi, M. A. (2013). Forced and voluntary exercises equally improve spatial learning and memory and hippocampal BDNF levels. *Behav. Brain Res.* 247, 34–39. doi: 10.1016/j.bbr.2013.03.007
- Alvarez-Sabin, J., and Román, G. C. (2011). Citoline in vascular cognitive impairment and vascular dementia after stroke. *Stroke* 42, S40–S43. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.606509
- Ang, E. T., Wong, P. T. H., Moochhala, S., and Ng, Y. K. (2003). Neuroprotection associated with running: is it a result of increased endogenous neurotrophic factors? *Neuroscience* 118, 335–345. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00989-2
- Bartolo, M., Zucchella, C., Capone, A., Sandrini, G., and Pierelli, F. (2015). An explorative study regarding the effect of l-deprenyl on cognitive and functional recovery in patients after stroke. *J. Neurol. Sci.* 349, 117–123. doi: 10.1016/j.jns.2014.12.039
- Béjot, Y., Mossiat, C., Giroud, M., Prigent-Tessier, A., and Marie, C. (2011). Circulating and brain BDNF levels in stroke rats. Relevance to clinical studies. *PLoS One* 6:e29405. doi: 10.1371/journal.pone.0029405
- Bentley, D. J., Newell, J., and Bishop, D. (2007). Incremental exercise test design and analysis: implications for performance diagnostics in endurance athletes. *Sports Med.* 37, 575–586. doi: 10.2165/00007256-200737070-00002

factors (BDNF and VEGF) in both elderly and stroke people that mediate beneficial neuroplasticity in brain areas involved in cognitive functions. We also identify some methodological limitations in both human and animal studies such as the standardization procedure of aerobic exercise intensity and the chosen cognitive tests, depending on the target population, that remain one of the most important concerns. Moreover, our review article suggests that the combination of aerobic training with other exercises/therapies or treatments represent a promising strategy with strong clinical perspectives. Importantly, this review highlights the lack of a firm guideline for exercise recommendations targeting recovery of cognition in stroke patient. Therefore, no standard aerobic protocol has yet been established as a commonly accepted reference regarding intensity, timing of training initiation and exercise type. It also appears that investigating changes in cognitive-motor interplay are critical to develop appropriate rehabilitation to improve both cognition and motor control after stroke.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed, have made substantial, direct, and intellectual contribution to the work, and approved its final version for publication. JL and J-JT: conceived the review focus, conducted literature review, summarized, and finalized the manuscript. PD: summarized, and finalized the manuscript. AC, CP-B and JL: reviewed literature, wrote first draft, and finalized the manuscript. All authors approved final version of manuscript.

## FUNDING

This work was supported by Aix-Marseille Université (AMU) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

- Berthier, M. L., Pulvermüller, F., Dávila, G., Casares, N. G., and Gutiérrez, A. (2011). Drug therapy of post-stroke aphasia: a review of current evidence. *Neuropsychol. Rev.* 21, 302–317. doi: 10.1007/s11065-011-9177-7
- Bherer, L., Erickson, K. I., and Liu-Ambrose, T. (2013). A review of the effects of physical activity and exercise on cognitive and brain functions in older adults. *J. Aging Res.* 2013:657508. doi: 10.1155/2013/657508
- Billinger, S. A., Arena, R., Bernhardt, J., Eng, J. J., Franklin, B. A., Johnson, C. M., et al. (2014). Physical activity and exercise recommendations for stroke survivors: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 45, 2532–2553. doi: 10.1161/STR.0000000000000022
- Billinger, S. A., Coughenour, E., Mackay-Lyons, M. J., and Ivey, F. M. (2012). Reduced cardiorespiratory fitness after stroke: biological consequences and exercise-induced adaptations. *Stroke Res. Treat.* 2012:959120. doi: 10.1155/2012/959120
- Bland, S. T., Schallert, T., Strong, R., Aronowski, J., Grotta, J. C., and Feeney, D. M. (2000). Early exclusive use of the affected forelimb after moderate transient focal ischemia in rats: functional and anatomic outcome. *Stroke* 31, 1144–1152. doi: 10.1161/01.str.31.5.1144
- Block, F., Dihné, M., and Loos, M. (2005). Inflammation in areas of remote changes following focal brain lesion. *Prog. Neurobiol.* 75, 342–365. doi: 10.1016/j.pneurobio.2005.03.004
- Bosch, P. R., Holzapfel, S., and Traustadottir, T. (2015). Feasibility of measuring ventilatory threshold in adults with stroke-induced hemiparesis: implications



- for exercise prescription. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 96, 1779–1784. doi: 10.1016/j.apmr.2015.04.023
- Boyne, P., Dunning, K., Carl, D., Gerson, M., Khoury, J., and Kissela, B. (2013). High-intensity interval training in stroke rehabilitation. *Top. Stroke Rehabil.* 20, 317–330. doi: 10.1310/tsr2004-317
- Boyne, P., Dunning, K., Carl, D., Gerson, M., Khoury, J., Rockwell, B., et al. (2016). High-intensity interval training and moderate-intensity continuous training in ambulatory chronic stroke: a feasibility study. *Phys. Ther.* doi: 10.2522/ptj.20150277 [Epub ahead of print].
- Carmichael, S. T., Tatsukawa, K., Katsman, D., Tsuyuguchi, N., and Kornblum, H. I. (2004). Evolution of diaschisis in a focal stroke model. *Stroke* 35, 758–763. doi: 10.1161/01.str.0000117235.11156.55
- Cassilhas, R. C., Lee, K. S., Fernandes, J., Oliveira, M. G. M., Tufik, S., Meeusen, R., et al. (2012). Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. *Neuroscience* 202, 309–317. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.029
- Cechetti, F., Worm, P. V., Elsner, V. R., Bertoldi, K., Sanches, E., Ben, J., et al. (2012). Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Neurobiol. Learn. Mem.* 97, 90–96. doi: 10.1016/j.nlm.2011.09.008
- Chae, C.-H., and Kim, H.-T. (2009). Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. *Neurochem. Int.* 55, 208–213. doi: 10.1016/j.neuint.2009.02.024
- Chang, Y.-K., Pan, C.-Y., Chen, F.-T., Tsai, C.-L., and Huang, C.-C. (2012). Effect of resistance-exercise training on cognitive function in healthy older adults: a review. *J. Aging Phys. Act.* 20, 497–517.
- Chapman, S. B., Aslan, S., Spence, J. S., DeFina, L. F., Keebler, M. W., Didehbandi, N., et al. (2013). Shorter term aerobic exercise improves brain, cognition and cardiovascular fitness in aging. *Front. Aging Neurosci.* 5:75. doi: 10.3389/fnagi.2013.00075
- Cherry, K. M., Lenze, E. J., and Lang, C. E. (2014). Combining D-cycloserine with motor training does not result in improved general motor learning in neurologically intact people or in people with stroke. *J. Neurophysiol.* 111, 2516–2524. doi: 10.1152/jn.00882.2013
- Churchill, J. D., Galvez, R., Colcombe, S., Swain, R. A., Kramer, A. F., and Greenough, W. T. (2002). Exercise, experience and the aging brain. *Neurobiol. Aging* 23, 941–955. doi: 10.1016/s0197-4580(02)00028-3
- Clark, P. J., Brzezinska, W. J., Thomas, M. W., Ryzhenko, N. A., Toshkov, S. A., and Rhodes, J. S. (2008). Intact neurogenesis is required for benefits of exercise on spatial memory but not motor performance or contextual fear conditioning in C57BL/6j mice. *Neuroscience* 155, 1048–1058. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.051
- Coelho, F. G., Gobbi, S., Andreatto, C. A. A., Corazza, D. I., Pedroso, R. V., and Santos-Galduróz, R. F. (2013). Physical exercise modulates peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): a systematic review of experimental studies in the elderly. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 56, 10–15. doi: 10.1016/j.archger.2012.06.003
- Cohen, J. A., Verghese, J., and Zwergling, J. L. (2016). Cognition and gait in older people. *Maturitas* doi: 10.1016/j.maturitas.2016.05.005 [Epub ahead of print].
- Colcombe, S. J., Erickson, K. I., Scalf, P. E., Kim, J. S., Prakash, R., McAuley, E., et al. (2006). Aerobic exercise training increases brain volume in aging humans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 61, 1166–1170. doi: 10.1093/gerona/61.11.1166
- Colcombe, S., and Kramer, A. F. (2003). Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. *Psychol. Sci.* 14, 125–130. doi: 10.1111/1467-9280.t01-1-01430
- Colcombe, S. J., Kramer, A. F., Erickson, K. I., Scalf, P., McAuley, E., Cohen, N. J., et al. (2004a). Cardiovascular fitness, cortical plasticity and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 3316–3321. doi: 10.1073/pnas.0400266101
- Colcombe, S. J., Kramer, A. F., McAuley, E., Erickson, K. I., and Scalf, P. (2004b). Neurocognitive aging and cardiovascular fitness: recent findings and future directions. *J. Mol. Neurosci.* 24, 9–14. doi: 10.1385/jmn:24:1:009
- Corriveau, R. A., Bosetti, F., Emr, M., Gladman, J. T., Koenig, J. I., Moy, C. S., et al. (2016). The science of vascular contributions to cognitive impairment and dementia (VCID): a framework for advancing research priorities in the cerebrovascular biology of cognitive decline. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 281–288. doi: 10.1007/s10571-016-0334-7
- Cotman, C. W., and Berchtold, N. C. (2002). Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci.* 25, 295–301. doi: 10.1016/s0166-2236(02)02143-4
- Cotman, C. W., Berchtold, N. C., and Christie, L.-A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci.* 30, 464–472. doi: 10.1016/j.tins.2007.06.011
- 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. doi: 10.1111/j.1747-4949.2012.00972.x
- Cumming, T. B., Tyedin, K., Churilov, L., Morris, M. E., and Bernhardt, J. (2012). The effect of physical activity on cognitive function after stroke: a systematic review. *Int. Psychogeriatr.* 24, 557–567. doi: 10.1017/s1041610211001980
- Cupini, L. M., Diomed, M., Placidi, F., Silvestrini, M., and Giacomini, P. (2001). Cerebrovascular reactivity and subcortical infarctions. *Arch. Neurol.* 58, 577–581. doi: 10.1001/archneur.58.4.577
- Deary, I. J., Corley, J., Gow, A. J., Harris, S. E., Houlihan, L. M., Marioni, R. E., et al. (2009). Age-associated cognitive decline. *Br. Med. Bull.* 92, 135–152. doi: 10.1093/bmb/ldp033
- DeBow, S. B., McKenna, J. E., Kolb, B., and Colbourne, F. (2004). Immediate constraint-induced movement therapy causes local hyperthermia that exacerbates cerebral cortical injury in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 82, 231–237. doi: 10.1139/y04-013
- Decourcelle, A., Moulin, S., Sibon, I., Murao, K., Ronzière, T., Godefroy, O., et al. (2015). Influence of previous physical activity on the outcome of patients treated by thrombolytic therapy for stroke. *J. Neurol.* 262, 2513–2519. doi: 10.1007/s00415-015-7875-4
- Ding, Y.-H., Li, J., Zhou, Y., Rafols, J. A., Clark, J. C., and Ding, Y. (2006). Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Curr. Neurovasc. Res.* 3, 15–23. doi: 10.2174/156720206775541787
- Doya, K. (2000). Complementary roles of basal ganglia and cerebellum in learning and motor control. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 732–739. doi: 10.1016/s0959-4388(00)00153-7
- Driscoll, I., Martin, B., An, Y., Maudsley, S., Ferrucci, L., Mattson, M. P., et al. (2012). Plasma BDNF is associated with age-related white matter atrophy but not with cognitive function in older, non-demented adults. *PLoS One* 7:e35217. doi: 10.1371/journal.pone.0035217
- Duzel, E., van Praag, H., and Sendtner, M. (2016). Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function? *Brain* 139, 662–673. doi: 10.1093/brain/awv407
- Ehlen, K. A., Reiser, R. F. II, and Browning, R. C. (2011). Energetics and biomechanics of inclined treadmill walking in obese adults. *Med. Sci. Sports Exerc.* 43, 1251–1259. doi: 10.1249/MSS.0b013e3182098a6c
- Elfving, B., Plougmann, P. H., Müller, H. K., Mathé, A. A., Rosenberg, R., and Wegener, G. (2010). Inverse correlation of brain and blood BDNF levels in a genetic rat model of depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13, 563–572. doi: 10.1017/S1461145709990721
- El-Tamawy, M. S. S., Abd-Allah, F., Ahmed, S. M., Darwish, M. H., and Khalifa, H. A. (2014). Aerobic exercises enhance cognitive functions and brain derived neurotrophic factor in ischemic stroke patients. *NeuroRehabilitation* 34, 209–213. doi: 10.3233/NRE-131020
- Erickson, K. I., and Kramer, A. F. (2009). Aerobic exercise effects on cognitive and neural plasticity in older adults. *Br. J. Sports Med.* 43, 22–24. doi: 10.1136/bjism.2008.052498
- Erickson, K. I., Miller, D. L., and Roecklein, K. A. (2012). The aging hippocampus: interactions between exercise, depression and BDNF. *Neuroscientist* 18, 82–97. doi: 10.1177/1073858410397054
- Faude, O., Kindermann, W., and Meyer, T. (2009). Lactate threshold concepts: how valid are they? *Sports Med.* 39, 469–490. doi: 10.2165/00007256-200939060-00003
- Feeney, D. M., Gonzalez, A., and Law, W. A. (1982). Amphetamine, haloperidol and experience interact to affect rate of recovery after motor cortex injury. *Science* 217, 855–857. doi: 10.1126/science.7100929
- Gao, Y., Zhao, Y., Pan, J., Yang, L., Huang, T., Feng, X., et al. (2014). Treadmill exercise promotes angiogenesis in the ischemic penumbra of rat brains through caveolin-1/VEGF signaling pathways. *Brain Res.* 1585, 83–90. doi: 10.1016/j.brainres.2014.08.032
- Gjellesvik, T. I., Brurok, B., Hoff, J., Tørhaug, T., and Helgerud, J. (2012). Effect of high aerobic intensity interval treadmill walking in people with chronic stroke:

- a pilot study with one year follow-up. *Top. Stroke Rehabil.* 19, 353–360. doi: 10.1310/tsr1904-353
- Globas, C., Becker, C., Cerny, J., Lam, J. M., Lindemann, U., Forrester, L. W., et al. (2012). Chronic stroke survivors benefit from high-intensity aerobic treadmill exercise: a randomized control trial. *Neurorehabil. Neural Repair* 26, 85–95. doi: 10.1177/1545968311418675
- Gordon, B. A., Rykhlevskaia, E. I., Brumback, C. R., Lee, Y., Elavsky, S., Konopack, J. F., et al. (2008). Neuroanatomical correlates of aging, cardiopulmonary fitness level and education. *Psychophysiology* 45, 825–838. doi: 10.1111/j.1469-8986.2008.00676.x
- Graybiel, A. M. (1995). Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 733–741. doi: 10.1016/0959-4388(95)80100-6
- Greenwood, P. M., and Parasuraman, R. (2010). Neuronal and cognitive plasticity: a neurocognitive framework for ameliorating cognitive aging. *Front. Aging Neurosci.* 2:150. doi: 10.3389/fnagi.2010.00150
- Griesbach, G. S., Hovda, D. A., and Gomez-Pinilla, F. (2009). Exercise-induced improvement in cognitive performance after traumatic brain injury in rats is dependent on BDNF activation. *Brain Res.* 1288, 105–115. doi: 10.1016/j.brainres.2009.06.045
- Griesbach, G. S., Hovda, D. A., Molteni, R., Wu, A., and Gomez-Pinilla, F. (2004). Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. *Neuroscience* 125, 129–139. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.01.030
- Hajjar, K., Fulton, R. L., Diener, H.-C., Lees, K. R., and the VISTA Collaborators. (2013). Does the cognitive measure Cog-4 show improvement among patients treated with thrombolysis after acute stroke? *Int. J. Stroke* 8, 652–656. doi: 10.1111/j.1747-4949.2012.00848.x
- Harada, C. N., Natelson Love, M. C., and Triebel, K. L. (2013). Normal cognitive aging. *Clin. Geriatr. Med.* 29, 737–752. doi: 10.1016/j.cger.2013.07.002
- Harris, I. M., Wong, C., and Andrews, S. (2015). Visual field asymmetries in object individuation. *Conscious. Cogn.* 37, 194–206. doi: 10.1016/j.concog.2015.09.004
- Hayes, K., Sprague, S., Guo, M., Davis, W., Friedman, A., Kumar, A., et al. (2008). Forced, not voluntary, exercise effectively induces neuroprotection in stroke. *Acta Neuropathol.* 115, 289–296. doi: 10.1007/s00401-008-0340-z
- Ivey, F. M., Macko, R. F., Ryan, A. S., and Hafer-Macko, C. E. (2005). Cardiovascular health and fitness after stroke. *Top. Stroke Rehabil.* 12, 1–16. doi: 10.1310/geeu-yrup-vj72-lear
- Ji, J., Ji, S., Sun, R., Li, K., Zhang, Y., Zhang, L., et al. (2014). Forced running exercise attenuates hippocampal neurogenesis impairment and the neurocognitive deficits induced by whole-brain irradiation via the BDNF-mediated pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 646–651. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.031
- Johnson, M. D., and Ojemann, G. A. (2000). The role of the human thalamus in language and memory: evidence from electrophysiological studies. *Brain Cogn.* 42, 218–230. doi: 10.1006/brcg.1999.1101
- Joseph, J. A., Shukitt-Hale, B., Casadesus, G., and Fisher, D. (2005). Oxidative stress and inflammation in brain aging: nutritional considerations. *Neurochem. Res.* 30, 927–935. doi: 10.1007/s11064-005-6967-4
- Karbe, H., Szelies, B., Herholz, K., and Heiss, W.-D. (1990). Impairment of language is related to left parieto-temporal glucose metabolism in aphasic stroke patients. *J. Neurol.* 237, 19–23. doi: 10.1007/bf00319662
- Karege, F., Schwald, M., and Cisse, M. (2002). Postnatal developmental profile of brain-derived neurotrophic factor in rat brain and platelets. *Neurosci. Lett.* 328, 261–264. doi: 10.1016/s0304-3940(02)00529-3
- Kauranen, T., Turunen, K., Laari, S., Mustanoja, S., Baumann, P., and Poutiainen, E. (2013). The severity of cognitive deficits predicts return to work after a first-ever ischaemic stroke. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 84, 316–321. doi: 10.1136/jnnp-2012-302629
- Ke, Z., Yip, S.-P., Li, L., Zheng, X.-X., Tam, W.-K., and Tong, K.-Y. (2011). The effects of voluntary, involuntary and forced exercises on motor recovery in a stroke rat model. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.* 2011, 8223–8226. doi: 10.1109/IEMBS.2011.6092028
- Kemi, O. J., Loennechen, J. P., Wisløff, U., and Ellingsen, Ø. (2002). Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J. Appl. Physiol.* (1985) 93, 1301–1309. doi: 10.1152/jappphysiol.00231.2002
- Kirchner, L., Chen, W.-Q., Afjehi-Sadat, L., Viidik, A., Skalicky, M., Höger, H., et al. (2008). Hippocampal metabolic proteins are modulated in voluntary and treadmill exercise rats. *Exp. Neurol.* 212, 145–151. doi: 10.1016/j.expneurol.2008.03.014
- Kluding, P. M., Tseng, B. Y., and Billinger, S. A. (2011). Exercise and executive function in individuals with chronic stroke: a pilot study. *J. Neurol. Phys. Ther.* 35, 11–17. doi: 10.1097/NPT.0b013e318208ee6c
- Komulainen, P., Pedersen, M., Hänninen, T., Bruunsgaard, H., Lakka, T. A., Kivipelto, M., et al. (2008). BDNF is a novel marker of cognitive function in ageing women: the DR's EXTRA study. *Neurobiol. Learn. Mem.* 90, 596–603. doi: 10.1016/j.nlm.2008.07.014
- Kozłowski, D. A., James, D. C., and Schallert, T. (1996). Use-dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions. *J. Neurosci.* 16, 4776–4786.
- Kramer, A. F., and Erickson, K. I. (2007). Capitalizing on cortical plasticity: influence of physical activity on cognition and brain function. *Trends Cogn. Sci.* 11, 342–348. doi: 10.1016/j.tics.2007.06.009
- Kremer, C., Perren, F., Kappelin, J., Selariu, E., and Abul-Kasim, K. (2013). Prognosis of aphasia in stroke patients early after iv thrombolysis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 115, 289–292. doi: 10.1016/j.clineuro.2012.05.019
- Kwiatkowski, T. G., Libman, R. B., Frankel, M., Tilley, B. C., Morgenstern, L. B., Lu, M., et al. (1999). Effects of tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke at one year. National institute of neurological disorders and stroke recombinant tissue plasminogen activator stroke study group. *N. Engl. J. Med.* 340, 1781–1787. doi: 10.1056/NEJM199906103402302
- Leckie, R. L., Oberlin, L. E., Voss, M. W., Prakash, R. S., Szabo-Reed, A., Chaddock-Heyman, L., et al. (2014). BDNF mediates improvements in executive function following a 1-year exercise intervention. *Front. Hum. Neurosci.* 8:985. doi: 10.3389/fnhum.2014.00985
- Lemaire, P., and Hinault, T. (2014). Age-related differences in sequential modulations of poorer-strategy effects. *Exp. Psychol.* 61, 253–262. doi: 10.1027/1618-3169/a000244
- Leśniak, M., Bak, T., Czepiel, W., Seniów, J., and Członkowska, A. (2008). Frequency and prognostic value of cognitive disorders in stroke patients. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 26, 356–363. doi: 10.1159/000162262
- Lin, Y., Lu, X., Dong, J., He, X., Yan, T., Liang, H., et al. (2015). Involuntary, forced and voluntary exercises equally attenuate neurocognitive deficits in vascular dementia by the BDNF-pCREB mediated pathway. *Neurochem. Res.* 40, 1839–1848. doi: 10.1007/s11064-015-1673-3
- Lövdén, M., Bäckman, L., Lindenberger, U., Schaefer, S., and Schmiedek, F. (2010). A theoretical framework for the study of adult cognitive plasticity. *Psychol. Bull.* 136, 659–676. doi: 10.1037/a0020080
- Luo, C. X., Jiang, J., Zhou, Q. G., Zhu, X. J., Wang, W., Zhang, Z. J., et al. (2007). Voluntary exercise-induced neurogenesis in the posts ischemic dentate gyrus is associated with spatial memory recovery from stroke. *J. Neurosci. Res.* 85, 1637–1646. doi: 10.1002/jnr.21317
- Maass, A., Düzel, S., Goerke, M., Becke, A., Sobieray, U., Neumann, K., et al. (2015). Vascular hippocampal plasticity after aerobic exercise in older adults. *Mol. Psychiatry* 20, 585–593. doi: 10.1038/mp.2014.114
- Macko, R. F., Ivey, F. M., Forrester, L. W., Hanley, D., Sorkin, J. D., Katzell, L. I., et al. (2005). Treadmill exercise rehabilitation improves ambulatory function and cardiovascular fitness in patients with chronic stroke: a randomized, controlled trial. *Stroke* 36, 2206–2211. doi: 10.1161/01.str.0000181076.91805.89
- Marosi, K., Bori, Z., Hart, N., Sárga, L., Koltai, E., Radák, Z., et al. (2012). Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. *Neuroscience* 226, 21–28. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.09.001
- Marsden, D. L., Dunn, A., Callister, R., Levi, C. R., and Spratt, N. J. (2013). Characteristics of exercise training interventions to improve cardiorespiratory fitness after stroke: a systematic review with meta-analysis. *Neurorehabil. Neural Repair* 27, 775–788. doi: 10.1177/1545968313496329
- Marshall, R. S. (2015). Progress in intravenous thrombolytic therapy for acute stroke. *JAMA Neurol.* 72, 928–934. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.0835
- Martin, H. G. S., and Wang, Y. T. (2010). Blocking the deadly effects of the NMDA receptor in stroke. *Cell* 140, 174–176. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.014
- Marzolini, S., Oh, P., McIlroy, W., and Brooks, D. (2013). The effects of an aerobic and resistance exercise training program on cognition following stroke. *Neurorehabil. Neural Repair* 27, 392–402. doi: 10.1177/1545968312465192
- Matsuda, F., Sakakima, H., and Yoshida, Y. (2011). The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol. (Oxf.)* 201, 275–287. doi: 10.1111/j.1748-1708.2010.02174.x

- Mattlage, A. E., Ashenden, A. L., Lentz, A. A., Rippee, M. A., and Billinger, S. A. (2013). Submaximal and peak cardiorespiratory response after moderate-high intensity exercise training in subacute stroke. *Cardiopulm. Phys. Ther. J.* 24, 14–20.
- McAuley, E., Kramer, A. F., and Colcombe, S. J. (2004). Cardiovascular fitness and neurocognitive function in older adults: a brief review. *Brain Behav. Immun.* 18, 214–220. doi: 10.1016/j.bbi.2003.12.007
- McDonnell, M. N., Bryan, J., Smith, A. E., and Esterman, A. J. (2011). Assessing cognitive impairment following stroke. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 33, 945–953. doi: 10.1080/13803395.2011.575769
- Mizutani, K., Sonoda, S., Hayashi, N., Takasaki, A., Beppu, H., Saitoh, E., et al. (2010). Analysis of protein expression profile in the cerebellum of cerebral infarction rats after treadmill training. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 89, 107–114. doi: 10.1097/PHM.0b013e3181b3323b
- Monteleone, P., Tortorella, A., Martiadis, V., Serritella, C., Fuschino, A., and Maj, M. (2004). Opposite changes in the serum brain-derived neurotrophic factor in anorexia nervosa and obesity. *Psychosom. Med.* 66, 744–748. doi: 10.1097/01.psy.0000138119.12956.99
- Mura, K., Leys, D., Jacquin, A., Kitazono, T., Bordet, R., Béjot, Y., et al. (2014). Thrombolytic therapy for stroke in patients with preexisting cognitive impairment. *Neurology* 82, 2048–2054. doi: 10.1212/WNL.0000000000000493
- Musico, M., Emberti, L., Nappi, G., Caltagirone, C., and Italian Multicenter Study on Outcomes of Rehabilitation of Neurological Patients. (2003). Early and long-term outcome of rehabilitation in stroke patients: the role of patient characteristics, time of initiation and duration of interventions. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 84, 551–558. doi: 10.1053/apmr.2003.50084
- Ni, G.-X., Lei, L., and Zhou, Y.-Z. (2012). Intensity-dependent effect of treadmill running on lubricin metabolism of rat articular cartilage. *Arthritis Res. Ther.* 14:R256. doi: 10.1186/ar4101
- Nys, G. M. S., van Zandvoort, M. J., Algra, A., Kappelle, L. J., and de Haan, E. H. (2006). Cognitive and functional outcome after intravenous recombinant tissue plasminogen activator treatment in patients with a first symptomatic brain infarct. *J. Neurol.* 253, 237–241. doi: 10.1007/s00415-005-0966-x
- Påhlman, U., Sävborg, M., and Tarkowski, E. (2012). Cognitive dysfunction and physical activity after stroke: the Gothenburg cognitive stroke study in the elderly. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 21, 652–658. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2011.02.012
- Pan, W., Banks, W. A., Fasold, M. B., Bluth, J., and Kastin, A. J. (1998). Transport of brain-derived neurotrophic factor across the blood-brain barrier. *Neuropharmacology* 37, 1553–1561. doi: 10.1016/s0028-3908(98)00141-5
- Pang, M. Y. C., Charlesworth, S. A., Lau, R. W. K., and Chung, R. C. K. (2013). Using aerobic exercise to improve health outcomes and quality of life in stroke: evidence-based exercise prescription recommendations. *Cerebrovasc. Dis.* 35, 7–22. doi: 10.1159/000346075
- Park, J.-W., Bang, M.-S., Kwon, B.-S., Park, Y.-K., Kim, D.-W., Shon, S.-M., et al. (2010). Early treadmill training promotes motor function after hemorrhagic stroke in rats. *Neurosci. Lett.* 471, 104–108. doi: 10.1016/j.neulet.2010.01.020
- Patel, M. D., Coshall, C., Rudd, A. G., and Wolfe, C. D. A. (2002). Cognitive impairment after stroke: clinical determinants and its associations with long-term stroke outcomes. *J. Am. Geriatr. Soc.* 50, 700–706. doi: 10.1046/j.1532-5415.2002.50165.x
- Pendlebury, S. T., Cuthbertson, F. C., Welch, S. J. V., Mehta, Z., and Rothwell, P. M. (2010). Underestimation of cognitive impairment by mini-mental state examination versus the montreal cognitive assessment in patients with transient ischemic attack and stroke: a population-based study. *Stroke* 41, 1290–1293. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.579888
- Pereira, A. C., Huddleston, D. E., Brickman, A. M., Sosunov, A. A., Hen, R., McKhann, G. M., et al. (2007). An *in vivo* correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104, 5638–5643. doi: 10.1073/pnas.0611721104
- Petcu, E. B., Smith, R. A., Mirou, R. I., and Opris, M. M. (2010). Angiogenesis in old-aged subjects after ischemic stroke: a cautionary note for investigators. *J. Angiogenesis Res.* 2:26. doi: 10.1186/2040-2384-2-26
- Pin-Barre, C., and Laurin, J. (2015). Physical exercise as a diagnostic, rehabilitation and preventive tool: influence on neuroplasticity and motor recovery after stroke. *Neural Plast.* 2015:608581. doi: 10.1155/2015/608581
- Pirmoradi, M., Jemel, B., Gallagher, A., Tremblay, J., D'Hondt, F., Nguyen, D. K., et al. (2016). Verbal memory and verbal fluency tasks used for language localization and lateralization during magnetoencephalography. *Epilepsy Res.* 119, 1–9. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2015.11.015
- Ploughman, M., McCarthy, J., Bossé, M., Sullivan, H. J., and Corbett, D. (2008). Does treadmill exercise improve performance of cognitive or upper-extremity tasks in people with chronic stroke? A randomized cross-over trial. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 89, 2041–2047. doi: 10.1016/j.apmr.2008.05.017
- Poletti, C., Sleimen-Malkoun, R., Lemaire, P., and Temprado, J.-J. (2016). Sensorimotor strategic variations and sequential effects in young and older adults performing a Fitts' task. *Acta Psychol. (Amst.)* 163, 1–9. doi: 10.1016/j.actpsy.2015.10.003
- Poletti, C., Sleimen-Malkoun, R., Temprado, J.-J., and Lemaire, P. (2015). Older and younger adults' strategies in sensorimotor tasks: insights from Fitts' pointing task. *J. Exp. Psychol. Hum. Percept. Perform.* 41, 542–555. doi: 10.1037/xhp0000033
- Puga, G. M., Kokubun, E., Simões, H. G., Nakamura, F. Y., and Campbell, C. S. G. (2012). Aerobic fitness evaluation during walking tests identifies the maximal lactate steady state. *ScientificWorld Journal* 2012:769431. doi: 10.1100/2012/769431
- Quaney, B. M., Boyd, L. A., McDowd, J. M., Zahner, L. H., He, J., Mayo, M. S., et al. (2009). Aerobic exercise improves cognition and motor function poststroke. *Neurorehabil. Neural Repair* 23, 879–885. doi: 10.1177/1545968309338193
- Radák, Z., Kaneko, T., Tahara, S., Nakamoto, H., Pucso, J., Sasvári, M., et al. (2001). Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochem. Int.* 38, 17–23. doi: 10.1016/s0197-0186(00)00063-2
- Radák, Z., Toldy, A., Szabo, Z., Siamilis, S., Nyakas, C., Silye, G., et al. (2006). The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. *Neurochem. Int.* 49, 387–392. doi: 10.1016/j.neuint.2006.02.004
- Rafnsson, S. B., Deary, I. J., and Fowkes, F. (2009). Peripheral arterial disease and cognitive function. *Vasc. Med.* 14, 51–61. doi: 10.1177/1358863X08095027
- Rafnsson, S. B., Deary, I. J., Smith, F. B., Whiteman, M. C., Rumley, A., Lowe, G. D. O., et al. (2007). Cognitive decline and markers of inflammation and hemostasis: the Edinburgh artery study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 55, 700–707. doi: 10.1111/j.1532-5415.2007.01158.x
- Ramic, M., Emerick, A. J., Bollnow, M. R., O'Brien, T. E., Tsai, S.-Y., and Kartje, G. L. (2006). Axonal plasticity is associated with motor recovery following amphetamine treatment combined with rehabilitation after brain injury in the adult rat. *Brain Res.* 1111, 176–186. doi: 10.1016/j.brainres.2006.06.063
- Rand, D., Eng, J. J., Liu-Ambrose, T., and Tawashy, A. E. (2010). Feasibility of a 6-month exercise and recreation program to improve executive functioning and memory in individuals with chronic stroke. *Neurorehabil. Neural Repair* 24, 722–729. doi: 10.1177/1545968310368684
- Rasmussen, R. S., Overgaard, K., Hildebrandt-Eriksen, E. S., and Boysen, G. (2006). D-amphetamine improves cognitive deficits and physical therapy promotes fine motor rehabilitation in a rat embolic stroke model. *Acta Neurol. Scand.* 113, 189–198. doi: 10.1111/j.1600-0404.2005.00547.x
- Risedal, A., Zeng, J., and Johansson, B. B. (1999). Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 997–1003. doi: 10.1097/00004647-199909000-00007
- Rognmo, Ø., Hetland, E., Helgerud, J., Hoff, J., and Slørdahl, S. A. (2004). High intensity aerobic interval exercise is superior to moderate intensity exercise for increasing aerobic capacity in patients with coronary artery disease. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 11, 216–222. doi: 10.1097/01.hjr.0000131677.96762.0c
- Sakakima, H., Khan, M., Dhammu, T. S., Shunmugavel, A., Yoshida, Y., Singh, I., et al. (2012). Stimulation of functional recovery via the mechanisms of neurorepair by S-nitrosoglutathione and motor exercise in a rat model of transient cerebral ischemia and reperfusion. *Restor. Neurol. Neurosci.* 30, 383–396. doi: 10.3233/RNN-2012-110209
- Save-Pédebos, J., Pinabiaux, C., Dorfmüller, G., Sorbets, S. F., Delalande, O., Jambaqué, I., et al. (2016). The development of pragmatic skills in children after hemispherotomy: contribution from left and right hemispheres. *Epilepsy Behav.* 55, 139–145. doi: 10.1016/j.yebeh.2015.12.013
- Schaaf, M. J., Sibug, R. M., Duurland, R., Fluttert, M. F., Oitzl, M. S., De Kloet, E. R., et al. (1999). Corticosterone effects on BDNF mRNA expression in the rat hippocampus during morris water maze training. *Stress* 3, 173–183. doi: 10.3109/10253899909001121

- Schmidt, A., Wellmann, J., Schilling, M., Strecker, J.-K., Sommer, C., Schäbitz, W.-R., et al. (2014). Meta-analysis of the efficacy of different training strategies in animal models of ischemic stroke. *Stroke* 45, 239–247. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002048
- Shen, X., Li, A., Zhang, Y., Dong, X., Shan, T., Wu, Y., et al. (2013). The effect of different intensities of treadmill exercise on cognitive function deficit following a severe controlled cortical impact in rats. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 21598–21612. doi: 10.3390/ijms141121598
- Shih, P.-C., Yang, Y.-R., and Wang, R.-Y. (2013). Effects of exercise intensity on spatial memory performance and hippocampal synaptic plasticity in transient brain ischemic rats. *PLoS One* 8:e78163. doi: 10.1371/journal.pone.0078163
- Shimada, H., Hamakawa, M., Ishida, A., Tamakoshi, K., Nakashima, H., and Ishida, K. (2013). Low-speed treadmill running exercise improves memory function after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Behav. Brain Res.* 243, 21–27. doi: 10.1016/j.bbr.2012.12.018
- Silhoh, M., Bonnichon, V., Rage, F., and Tapia-Arancibia, L. (2005). Age-related changes in brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor isoforms in the hippocampus and hypothalamus in male rats. *Neuroscience* 132, 613–624. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.01.008
- Sleimen-Malkoun, R., Temprado, J.-J., and Berton, E. (2013). Age-related dedifferentiation of cognitive and motor slowing: insight from the comparison of Hick-Hyman and Fitts' laws. *Front. Aging Neurosci.* 5:62. doi: 10.3389/fnagi.2013.00062
- Sleimen-Malkoun, R., Temprado, J.-J., Huys, R., Jirsa, V., and Berton, E. (2012). Is Fitts' law continuous in discrete aiming? *PLoS One* 7:e41190. doi: 10.1371/journal.pone.0041190
- Sopova, K., Gatsiou, K., Stellos, K., and Laske, C. (2014). Dysregulation of neurotrophic and haematopoietic growth factors in Alzheimer's disease: from pathophysiology to novel treatment strategies. *Curr. Alzheimer Res.* 11, 27–39. doi: 10.2174/1567205010666131120100743
- Soya, H., Nakamura, T., Deocaris, C. C., Kimpara, A., Iimura, M., Fujikawa, T., et al. (2007). BDNF induction with mild exercise in the rat hippocampus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358, 961–967. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.173
- Sun, J.-H., Ke, Z., Yip, S. P., Hu, X., Zheng, X., and Tong, K. (2014a). Gradually increased training intensity benefits rehabilitation outcome after stroke by BDNF upregulation and stress suppression. *Biomed Res. Int.* 2014:925762. doi: 10.1155/2014/925762
- Sun, J.-H., Tan, L., and Yu, J.-T. (2014b). Post-stroke cognitive impairment: epidemiology, mechanisms and management. *Ann. Transl. Med.* 2:80. doi: 10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.05
- Sun, M.-W., Qian, F.-L., Wang, J., Tao, T., Guo, J., Wang, L., et al. (2008). Low-intensity voluntary running lowers blood pressure with simultaneous improvement in endothelium-dependent vasodilatation and insulin sensitivity in aged spontaneously hypertensive rats. *Hypertens. Res.* 31, 543–552. doi: 10.1291/hyres.31.543
- Swain, R. A., Harris, A. B., Wiener, E. C., Dutka, M. V., Morris, H. D., Theien, B. E., et al. (2003). Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience* 117, 1037–1046. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00664-4
- Takamatsu, Y., Ishida, A., Hamakawa, M., Tamakoshi, K., Jung, C.-G., and Ishida, K. (2010). Treadmill running improves motor function and alters dendritic morphology in the striatum after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Res.* 1355, 165–173. doi: 10.1016/j.brainres.2010.07.070
- Takamatsu, Y., Tamakoshi, K., Waseda, Y., and Ishida, K. (2016). Running exercise enhances motor functional recovery with inhibition of dendritic regression in the motor cortex after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Behav. Brain Res.* 300, 56–64. doi: 10.1016/j.bbr.2015.12.003
- Tang, A., Marzolini, S., Oh, P., McLroy, W. E., and Brooks, D. (2013). Factors associated with change in aerobic capacity following an exercise program for individuals with stroke. *J. Rehabil. Med.* 45, 32–37. doi: 10.2340/16501977-1053
- Tatemichi, T. K., Desmond, D. W., Mayeux, R., Paik, M., Stern, Y., Sano, M., et al. (1992). Dementia after stroke Baseline frequency, risks and clinical features in a hospitalized cohort. *Neurology* 42, 1185–1193. doi: 10.1212/wnl.42.6.1185
- 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. doi: 10.1136/jnnp.57.2.202
- Temprado, J.-J., Sleimen-Malkoun, R., Lemaire, P., Rey-Robert, B., Retornaz, F., and Berton, E. (2013). Aging of sensorimotor processes: a systematic study in Fitts' task. *Exp. Brain Res.* 228, 105–116. doi: 10.1007/s00221-013-3542-0
- Temprado, J.-J., Zanone, P.-G., Monno, A., and Laurent, M. (1999). Attentional load associated with performing and stabilizing preferred bimanual patterns. *J. Exp. Psychol. Hum. Percept. Perform.* 25, 1579–1594. doi: 10.1037/0096-1523.25.6.1579
- Thompson, B. J., and Ronaldson, P. T. (2014). Drug delivery to the ischemic brain. *Adv. Pharmacol.* 71, 165–202. doi: 10.1016/bs.apha.2014.06.013
- Tiozzo, E., Youbi, M., Dave, K., Perez-Pinzon, M., Rundek, T., Sacco, R. L., et al. (2015). Aerobic, resistance and cognitive exercise training poststroke. *Stroke* 46, 2012–2016. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006649
- Unal, I., Gürsoy-Ozdemir, Y., Bolay, H., Söylemezoglu, F., Saribas, O., and Dalkara, T. (2001). Chronic daily administration of selegiline and EGB 761 increases brain's resistance to ischemia in mice. *Brain Res.* 917, 174–181. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02914-6
- Vaynman, S., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2003). Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience* 122, 647–657. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.08.001
- Vaynman, S., Ying, Z., and Gomez-Pinilla, F. (2004). Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. *Eur. J. Neurosci.* 20, 2580–2590. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03720.x
- Ventriglia, M., Zanardini, R., Bonomini, C., Zanetti, O., Volpe, D., Pasqualetti, P., et al. (2013). Serum brain-derived neurotrophic factor levels in different neurological diseases. *Biomed Res. Int.* 2013:901082. doi: 10.1155/2013/901082
- Voss, M. W., Erickson, K. I., Prakash, R. S., Chaddock, L., Kim, J. S., Alves, H., et al. (2013). Neurobiological markers of exercise-related brain plasticity in older adults. *Brain Behav. Immun.* 28, 90–99. doi: 10.1016/j.bbi.2012.10.021
- Voss, M. W., Erickson, K. I., Prakash, R. S., Chaddock, L., Malkowski, E., Alves, H., et al. (2010a). Functional connectivity: a source of variance in the association between cardiorespiratory fitness and cognition? *Neuropsychologia* 48, 1394–1406. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2010.01.005
- Voss, M. W., Prakash, R. S., Erickson, K. I., Basak, C., Chaddock, L., Kim, J. S., et al. (2010b). Plasticity of brain networks in a randomized intervention trial of exercise training in older adults. *Front. Aging Neurosci.* 2:32. doi: 10.3389/fnagi.2010.00032
- Waldstein, S. R., and Wendell, C. R. (2010). Neurocognitive function and cardiovascular disease. *J. Alzheimers Dis.* 20, 833–842. doi: 10.3233/JAD-2010-091591
- Wang, Q., Tang, X. N., and Yenari, M. A. (2007). The inflammatory response in stroke. *J. Neuroimmunol.* 184, 53–68. doi: 10.1016/j.jneuroim.2006.11.014
- Wiesmann, C., and de Vos, A. M. (2001). Nerve growth factor: structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 748–759. doi: 10.1007/PL00000898
- Wilcock, G. K., Birks, J., Whitehead, A., and Evans, S. J. G. (2002). The effect of selegiline in the treatment of people with Alzheimer's disease: a meta-analysis of published trials. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 17, 175–183. doi: 10.1002/gps.545
- Wisløff, U., Helgerud, J., Kemi, O. J., and Ellingsen, O. (2001). Intensity-controlled treadmill running in rats: VO(2 max) and cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280, H1301–H1310.
- Wisløff, U., Støylen, A., Loennechen, J. P., Bruvold, M., Rognum, Ø., Haram, P. M., et al. (2007). Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation* 115, 3086–3094. doi: 10.1161/circulationaha.106.675041
- Wogensen, E., Malá, H., and Mogensen, J. (2015). The effects of exercise on cognitive recovery after acquired brain injury in animal models: a systematic review. *Neural Plast.* 2015:830871. doi: 10.1155/2015/830871
- Wurm, F., Keiner, S., Kunze, A., Witte, O. W., and Redecker, C. (2007). Effects of skilled forelimb training on hippocampal neurogenesis and spatial learning after focal cortical infarcts in the adult rat brain. *Stroke* 38, 2833–2840. doi: 10.1161/strokeaha.107.485524
- Xu, F., and Rhodes, E. C. (1999). Oxygen uptake kinetics during exercise. *Sports Med.* 27, 313–327. doi: 10.2165/00007256-199927050-00003
- Yaka, R., Biegón, A., Grigoriadis, N., Simeonidou, C., Grigoriadis, S., Alexandrovich, A. G., et al. (2007). D-cycloserine improves functional recovery

- and reinstates long-term potentiation (LTP) in a mouse model of closed head injury. *FASEB J.* 21, 2033–2041. doi: 10.1096/fj.06-7856com
- Zhang, P., Yu, H., Zhou, N., Zhang, J., Wu, Y., Zhang, Y., et al. (2013a). Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model. *J. Neuroeng. Rehabil.* 10:43. doi: 10.1186/1743-0003-10-43
- Zhang, P., Zhang, Y., Zhang, J., Wu, Y., Jia, J., Wu, J., et al. (2013b). Early exercise protects against cerebral ischemic injury through inhibiting neuron apoptosis in cortex in rats. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 6074–6089. doi: 10.3390/ijms14036074
- Zhang, P., Zhang, Q., Pu, H., Wu, Y., Bai, Y., Vosler, P. S., et al. (2012). Very early-initiated physical rehabilitation protects against ischemic brain injury. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 4, 2476–2489. doi: 10.2741/e559

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2016 Constans, Pin-Barre, Temprado, Decherchi and Laurin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution and reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Functional and Neuromuscular Changes after Anterior Cruciate Ligament Rupture in Rats

JÉRÔME LAURIN<sup>1</sup>, CAROLINE PIN-BARRE<sup>1,2</sup>, GÉRÔME BERNARD<sup>1</sup>, ERICK DOUSSET<sup>1</sup>, and PATRICK DECHERCHI<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Aix-Marseille Université, CNRS, Marseille, FRANCE; and <sup>2</sup>Université Nice Sophia Antipolis, LAMHESS, Nice, FRANCE

## ABSTRACT

LAURIN, J., C. PIN-BARRE, G. BERNARD, E. DOUSSET, and P. DECHERCHI. Functional and Neuromuscular Changes after Anterior Cruciate Ligament Rupture in Rats. *Med. Sci. Sports Exerc.*, Vol. 48, No. 6, pp. 1033–1043, 2016. **Purpose:** This study was designed to highlight the functional impairments and the neuromuscular adaptations following an anterior cruciate ligament (ACL) injury in rat. **Methods:** Animals were randomized into five groups: control ( $n = 8$ ), SHAM-1wk ( $n = 6$ ), SHAM-5wk ( $n = 8$ ), ACL-1wk ( $n = 8$ ), and ACL-5wk ( $n = 8$ ). Rats performed three behavioral tests (the ladder-climbing test, the dynamic weight-bearing distribution, and the dynamic function assessment during locomotion) before the surgery (PRE) and at day (D) 1 (D1), D2, D3, D5, D7, D14, D21, D28, and D35 after ACL transection. Electrophysiological recordings, including responses of muscle metabosensitive afferents to a combination of specific chemical activators, namely, lactic acid and potassium chloride, and the quadriceps motor reflex activity, were performed at D7 (ACL-1wk) and at D35 (SHAM and ACL-5wk). **Results:** Behavioral results indicated an alteration of both weight-bearing distribution over the four paws and fine motor skills (ladder-climbing test) for the injured animals. Maximal motor reflex amplitude was higher after ACL injury compared with the other groups. Moreover, the regulation of motor reflex induced by metabosensitive afferents was perturbed from the first week after ACL transection, without affecting the response of these muscle afferents to their specific stimuli. **Conclusions:** This study brings some new evidence about the motor dysfunctions and spinal adaptations after ACL rupture in rats. Such information might be needed for assessing, in our animal model, the effectiveness of the diverse functional rehabilitation strategies used in human clinic after knee injuries. **Key Words:** KNEE JOINT INJURY, SENSORIMOTOR REFLEX ADAPTATION, WEIGHT-BEARING DISTRIBUTION, GROUP III AND IV MUSCLE AFFERENTS, LOCOMOTOR DISORDERS, RAT

Despite the anterior cruciate ligament (ACL), rupture remains the most common knee injury for young active population and elite athletes (32), the neuromuscular mechanisms remain poorly understood (7). It seems thus crucial to improve the understanding of the ACL injury-induced motor function deficits.

It is well recognized that ACL injury-induced functional deficits were not only associated with knee joint disturbances but also partially explained by neuromuscular activity changes (9). Indeed, sensory inputs from ligament afferents seem to play an important role in muscle coordination and in the reflex regulation of the functional joint stability (13,29). At the neuromuscular level, some evidence indicated that ACL rupture was accompanied by an EMG activity alteration during maximal force production and

locomotor activity (9). Moreover, some authors indicated that motor reflex (similar to stretch reflex) activity of the surrounding muscles after ACL injury was facilitated, or even inhibited, whereas others have shown no influence on reflex amplitude (20,25). To clarify the ACL injury influence on motor reflex, it seems appropriate to directly investigate the mechanisms responsible of the motor reflex regulation after such ligament lesion.

The motor reflex was partially regulated by both mechanosensitive and metabosensitive articular and muscle afferents (35). Given that ACL injury could disturb articular, cutaneous, and mainly muscle mechanosensitive (proprioceptive) information, it was suggested, both in animal and human studies, that these sensitive impairments might contribute to motor reflex alteration (2,4,12). Furthermore, previous studies indicated that the muscle metabosensitive (groups III and IV) afferent activity was also disturbed after medial collateral ligament (MCL) injury in rats, affecting motor reflex activity (16). These thin muscle afferents respond to the accumulation of several metabolites into active muscles such as potassium chloride (KCl), lactic acid (LA), and  $\alpha,\beta$ -methylene adenosine triphosphate (ATP), and are known to regulate the central motor drive and adjust the cardiorespiratory activity (5,26). Although one human study suggested that this knee lesion might affect the metabosensitive afferents (36), no evidence was found on the influence of ACL injury on muscle metabosensitive afferent actions. Such mechanisms could be assessed in rats by measuring their

---

Address for correspondence: Dr. Jérôme Laurin, Ph.D., Aix-Marseille Université and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7287, Institut des Sciences du Mouvement, Etienne-Jules MAREY, Équipe, Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, Faculté des Sciences du Sport, CC910-163, Avenue de Luminy, 13288 Marseille Cedex 09, France; E-mail: jerome.laurin@univ-amu.fr.

Submitted for publication August 2015.

Accepted for publication December 2015.

0195-9131/16/4806-1033/0

MEDICINE & SCIENCE IN SPORTS & EXERCISE®

Copyright © 2015 by the American College of Sports Medicine

DOI: 10.1249/MSS.0000000000000860

response to specific chemical activators and their role on spinal motor adaptation.

This study was thus designed to determine the outcomes of ACL transection on functional deficits and on neuromuscular plasticity in rats. For that, the severity of functional deficits was assessed by the use of three behavioral tests and the changes of motor reflex regulation after metabosensitive afferents activation were also measured. This spinal neuromuscular adaptation was performed not only during the inflammatory period (1 wk) known to modulate motor activity but also after this phase (5 wk) (10,38).

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Thirty-eight adult female Sprague–Dawley rats, weighting exclusively between 250 and 300 g (Élevage JANVIER®; Centre d'Élevage Roger JANVIER, Le Genest Saint Isle, France), were singly housed in smooth-bottomed plastic cages in a colony room maintained on a 12-h light–dark cycle. Food (rat chow; Safe®, Augy, France) and water were available *ad libitum*. The room temperature was maintained at 22°C. The weight of the rats was daily controlled. To acustom the animals to the laboratory environment, an acclimation period of 2 wk was allowed before the initiation of the experiment. Anesthesia and surgical procedures were performed according to the French law on animal care guidelines and the Animal Care Committees of Aix-Marseille Université and Centre National de la Recherche Scientifique approved our protocols. Furthermore, experiments were performed following the recommendations provided in the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health) and in accordance with the European Community council directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). No sign of screech, prostration, drastic weight loss, and hyperactivity were observed through the experiment.

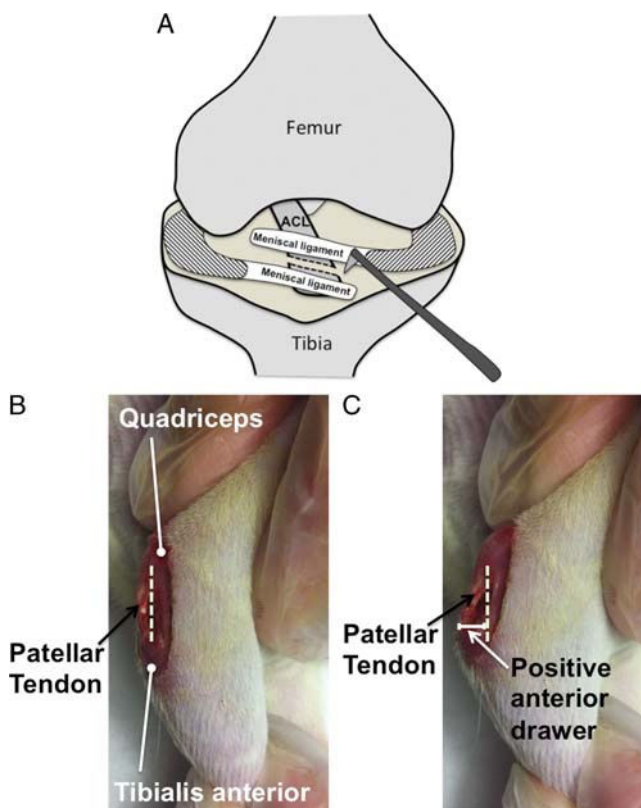
Animals were randomly assigned to the following five groups: 1) control ( $n = 8$ ) in which no surgery was performed, 2) SHAM-1wk group ( $n = 6$ ) in which electrophysiological measurements were performed 1 wk after surgery without ACL transection, 3) SHAM-5wk group ( $n = 8$ ) in which electrophysiological measurements were performed 5 wk after surgery without ACL transection, 4) ACL-1wk group ( $n = 8$ ) in which electrophysiological measurements were performed 1 wk after ACL transection, and 5) ACL-5wk group ( $n = 8$ ) in which electrophysiological measurements were performed 5 wk after ACL transection.

### Surgical Procedures: ACL Transection and SHAM Surgery

**ACL transection of the left knee.** Throughout the surgery, central temperature was maintained at about 37°C–38°C with a homeothermic blanket (Homeothermic Blanket Control Unit, K01345CE; Harvard Apparatus, Holliston, MA)

driven by a rectal thermal probe. Animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of chloral hydrate (Sigma®, 60 mg·kg<sup>-1</sup>). The rat was then positioned in dorsal decubitus throughout the surgery and the left knee stayed in flexed position for accessing ACL. Using an operating microscope (×40, OPM 11; Zeiss, Oberkochen, Germany) and under aseptic conditions, a 2-cm lateral incision through the skin and fascia (in parallel with patellar tendon without damaging it) was performed to expose the ACL using a high-temperature cautery handle (Low Cost Cauterizer Kit, Bovie®; Fine Science Tool®). Quadriceps and tibialis anterior muscles, blood, and nerve supplies were kept intact during such procedure. A scalpel-curved blade was inserted into the articular capsule between the two-meniscal ligaments (without cutting them) until the central part of the tibial plateau. Menisci were thus not removed in this study. The ACL was then transected (Fig. 1A).

The same experimenter for all animals manually performed the anterior drawer test to ensure that ACL was well completely transected (Figs. 1B and C). When the ACL was incompletely disrupted, there was no anterior displacement. However, when ACL was ruptured, the anterior displacement was clearly detected (no resistance during this test procedure). Therefore, there is a clear anterior displacement



**FIGURE 1**—Surgery of ACL rupture and anterior drawer test. **A**, Schematic surgical procedure of ACL transection. **B**, The anterior drawer test before ACL transection. The tibia is drawn forward anteriorly by experimenter while the femur was maintained in a fixed position. **C**, The anterior drawer test after ACL transection. Excessive displacement of the tibia anteriorly indicated that the ACL is well transected.

or not at all. Finally, the skin was sutured, and animals were returned in individual cages.

**SHAM surgery.** SHAM animals enable to assess the influence of skin cutting, joint capsule disturbances, and associated inflammation. As mentioned above, these surgical procedures were inevitable before sectioning the ACL. For that, ACL was also exposed in the same manner as described above. However, the ACL was not transected. No meniscectomy was performed as for ACL rupture surgery. The anterior drawer test was performed before suturing the skin. No anterior displacement was observed by visual inspection.

## Behavioral Tests

In the first step, animals were familiarized with the behavioral tests 3 d·wk<sup>-1</sup> during 2 wk, except for dynamic weight-bearing test because it is not recommended (34). The experimenters, performing behavioral assessment and electrophysiological recordings, were blind to the assignment of animals to specific groups. Reference value (PRE, i.e. prevalue before knee surgery) was then recorded for each test. After surgery with or without ACL transection, behavioral tests were performed at day (D) 1 (D1), D2, D3, D5, D7, D14, D21, D28, and D35.

**Ladder-climbing test.** This test is used to evaluate the sensorimotor capacities to correctly reach the rungs while rats climbed up a ladder (length, 100 cm; width scale, 13 cm; inclination, 45° angle) (21). This test was used to assess the left hindlimb sensorimotor capacities. The animals walked across the inclined ladder with rungs of equal spacing (1 cm). The video analysis of the left hindlimb step was recorded with a numerical camcorder (Canon®, MV 830i; Courbevoie, France) at a 100-Hz acquisition frequency. The rats performed four to five trials per testing session to obtain 20 steps minimum of the left hindlimb. Then, the number of mistakes, misses or slips, per crossing was taken into account as follows: if the rung was completely missed by the left hindpaw (LH), the score was 0 point. If the paw slipped on the rung or the support was incomplete, the score was 1 point. Moreover, if the left paw touched intermediate rungs during the swing phase, the score was also 1 point (even if the left hind limb correctly reach the rung). If the support on the rung was correct (i.e., at the base of toe foot), the score was 2 points. For each testing session, the successful score was normalized with the maximal score, depending on the number of performed steps. Results were expressed as percentage of PRE values.

**Dynamic weight-bearing test.** The dynamic weight-bearing test assesses the weight-bearing by each of the four paws in static conditions, and thus, allows quantifying and characterizing postural adaptation/impairments after injury (23). The weight-bearing distribution was assessed by a biometric floor instrumented cage (DWB, Bioseb® Development, Vitrolles, France). The device consisted of a Plexiglas® enclosure (W22 × L22 × H30 cm<sup>3</sup>) with a calibrated weight transducer pad composed of captors (captors, 44 × 44; captor

surface, 10.89 mm<sup>2</sup>; captor threshold, 0.1 g; matrix sensor 5250 type, /10; Tekscan Inc. Boston, MA). The top of the device was equipped by a camcorder to identify the four paws during recording. This test is performed on free moving rats (hence, the term dynamic) within the device for two trials of 5 min each. However, the paw weight-bearing can only be analyzed in static position periods during trials. Only stable paw weight-bearing of at least 0.2 s were kept for further analysis.

Several parameters were measured: 1) the weight-bearing exerted by each paw (g) which was only measured when the four paws were in contact with the biometric floor and then normalized by the total weight of the rat (expressed in % of total weight) to avoid the influence of rat weight (left forepaw [LF], right forepaw [RF]; LH; right hindpaw [RH]). Thus, ratios distinguishing the forepaws versus hindpaws and the right versus left sides were also calculated; 2) the sum of the RF and the LF normalized by the sum of the RH and the LH (F/H ratio); 3) the LF normalized by the RF (LF/RF ratio); and 4) the LH normalized by the RH (LH/RH ratio).

**Kinematic analysis of locomotor activity.** The locomotor pattern of the left hindlimb was assessed on treadmill at low speed (15 m·min<sup>-1</sup>, walking) and high-speed (30 m·min<sup>-1</sup>, running). Locomotor activity was recorded with a numerical camcorder (100 Hz; Canon, MV 830i, Courbevoie, France), positioned perpendicular to the vertical plane of the treadmill to get a sagittal view of the gait cycles. Heavy lighting was provided with a spot (Photon lines; LED-N2 Multihead control unit, Saint-Germain-en-Laye, France).

The lower back and the left hindlimb were shaved before each recording. The hip joint (trochanter), the knee joint (*condylus femoralis*), the ankle joint (*lateralis malleolus*), and the fifth metatarsal head of the operated hindlimb were then marked with a black permanent marker. The measured gait parameter was the knee joint angle, which was defined as the intersection between the lines extended from the hip to the knee joint and the line from the knee joint to the ankle joint. Based on the position of the toe marker, the gait cycles were divided into a stance and a swing phase. The start of the stance phase was considered to be the point where the foot touches the ground, and the end, the point where the foot leaves the ground to begin the swing phase. The two-dimensional positions of the anatomical markers were tracked on each frame. Maximal and minimal knee angles were measured and averaged during the stance and swing phase on five gait cycles at each speed (15 m·min<sup>-1</sup> and 30 m·min<sup>-1</sup>). Likewise, the duration of the gait cycle and of both the swing and stance phases (s) was also measured. Processing of the gait parameters was performed using automatic analysis software (SimiMotion software; Simi, Unterschleissheim, Germany) and Matlab software (The MatWorks, version 8.0.0.783 R2012b).

## Electrophysiological Measurements

**Animal preparation.** Rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of urethane solution (1 mg·g<sup>-1</sup>).

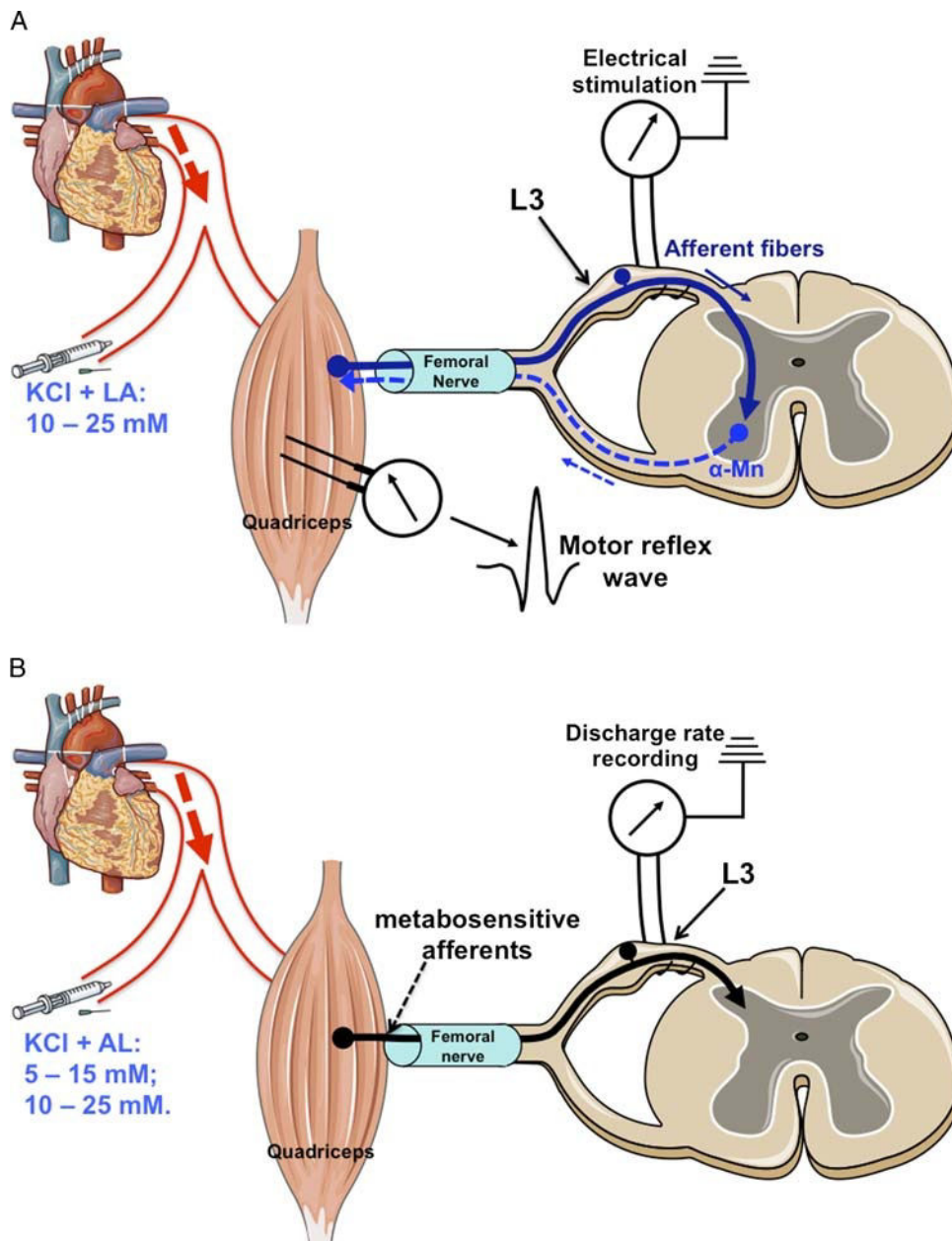


Central temperature was maintained at about 38°C with a homeothermic blanket driven by a rectal thermal probe. The surgical procedure consisted first to insert a catheter into the right femoral artery and pushed up to the fork of the abdominal aorta. This catheter was positioned to let the blood flow freely to the muscles of the left hindlimb to transport the chemical activators of muscle metabosensitive afferents (i.e., KCl and LA) to the contralateral muscles. Then, the nerves of left hindlimb were sectioned except for the femoral nerve to avoid the influence of other muscle afferents on the quadriceps afferent recording at the dorsal root.

The last part of the surgical procedure was devoted to expose the L3 dorsal root including quadriceps afferent

fibers (31) to evoke and record the motor reflex and the afferent firing rate, respectively. For that, a laminectomy was performed from L1 to L4 to expose dorsal and ventral roots. The dura was then removed to separate the dorsal and ventral roots. The rat head was then fixed in a stereotaxic device (WPI®; World Precision Instruments, Hertfordshire, United Kingdom), and the left hindlimb was firmly fixed at a 90°–100° angle.

**Electrically evoked motor reflex.** Single rectangular shocks were directly applied to the intact L3 dorsal root using a pair of steel hook electrodes with a 1-ms pulse duration generated by a constant current stimulator (Digitimer DS7 A®; Welwin, Garden City, Hertfordshire, United Kingdom)



**FIGURE 2**—Electrophysiological recordings. **A**, Experimental procedure for the recording of motor reflex evoked at the L3 dorsal root.  $\alpha$ -Mn:  $\alpha$ -motoneurons. **B**, Experimental procedure for the recording of afferent discharge rate at the L3 dorsal root.

(Fig. 2A). The amplitude of motor reflex was recorded using bipolar needle electrodes (MLA 1204 needle electrodes, 29-gauge, 2-mm pin; AD Instruments, Paris, France) inserted into the belly of the vastus lateralis muscle. Vastus lateralis was chosen because this muscle is larger and thicker than the other hindlimb muscles that facilitated the insertion of intramuscular EMG electrodes. The neural signals were referred to a ground electrode implanted in a nearby muscle, amplified (2 kHz), and filtered (30 Hz to 10 kHz) with a differential amplifier (P2MP; SARL, Marseille, France).

Electrical stimulation intensity was incrementally increased (by 0.01 mA increments) from 0 mA until there was no further increment in wave amplitude. Then, a series of 20 motor reflexes during 100 s (0.2 Hz) was performed to both control the stability of reflex amplitude and measure the maximal amplitude by averaging the 10 first reflexes (in mV). After 10–15 min of rest to avoid fatigue accumulation, the motor reflex was again evoked at 0.2 Hz before and after a combination of two specific chemical activators of muscle afferents: KCl (10 mM) and LA (25 mM). It allows us to measure the influence of metabosensitive afferents on motor reflex response. More specifically, six reference reflexes (PRE-injection) were evoked before chemical injection followed by 14 POST-injection reflexes. The six reference reflexes were averaged. Concerning the 14 POST-injection reflexes, two successive amplitude reflexes were averaged until the end of recording and compared to the six averaged reference reflexes. The POST-/PRE-injection ratio was calculated, and the maximal peak variation of motor reflex amplitude was also recorded (in % of PRE).

It was important to add that the location of the electrodes into the vastus lateralis was not changed during the overall recording to ensure a reliable comparison between PRE- and POST-measurements. Moreover, physiological saline was also injected instead of KCl-LA (data not shown). The next step consisted to stimulate the L3 ventral root to evoke three motor waves ( $M_{\max}$  wave) before and 10 other  $M_{\max}$  waves after a 10–25-mM KCl-LA injection. Therefore, we could assess a plausible modification of muscular membrane excitability induced by chemical injection, which could disturb the motor reflex response (40). An absence of  $M_{\max}$  modification after the injection might indicate that motor reflex changes were attributed to spinal and/or supraspinal mechanisms and not at the muscle level. Finally, the dorsal root was sectioned at the proximal level while evoking several motor reflexes to ensure the reflex origin of the observed wave amplitude (and not a direct motor response). The disappearance of the both reflex wave and associated motor response after dorsal root section was observed for all animals in this study.

**Firing rate recording of metabosensitive muscle afferents.** The L3 dorsal root was positioned on a pair of bipolar tungsten electrodes and immersed in paraffin oil (Fig. 2B). The position of the dorsal root was never changed during recordings. The neural signal was amplified (10–100 K) and filtered (30–10 kHz) with a differential amplifier and

was also referred to a ground electrode implanted in a nearby tissue. The afferent fiber activity was recorded and fed into pulse window discriminators (P2MP®; SARL), from which the discharge rate of afferents was extracted. The output of these discriminators providing noise-free tracings (discriminated units) was displayed on a computer on separate tracings using a data acquisition system (Biopac MP150® and AcqKnowledge software, Biopac System, Paris, France) at 2-s intervals.

Before injecting chemical stimuli, a baseline afferent recording was performed to ensure that the afferent discharge rate was stable. For that, the impulse activity was recorded during 210 s without chemical injection. The recording was considered acceptable if the fluctuation of baseline impulse activity did not exceed  $\pm 20\%$  throughout the recording. Consequently, the changes of recorded discharge rate after injections were related to the applied stimuli and not to environmental conditions. Baseline discharge recording could also be repeated between chemical injections. Once the baseline was established, different concentrations of a mixed solution of KCl-LA (5–15 mM and 10–25 mM; volume, 0.5 mL) were intra-arterially injected 60 s after the beginning of the discharge rate recording (PRE), which continued during 150 s (POST-injection). The injections were separated by 10 min of rest to limit the influence of one injection on the others (27).

The postinjection discharge rate was compared with the baseline discharge rate, and variations were expressed in percentage of the corresponding baseline discharge rate, that is, baseline discharge corresponded to 100%. The temporal profile of discharge rate variation and the extraction of the peak discharge rate after each injection were performed by a specific Matlab program (The MatWorks, version 8.0.0.783 R2012b) that was described elsewhere (15). Briefly, the discharge rate was measured on 20-s periods all along the recording period, in which the discharge rate was calculated on different time interval lasting from 1 to 20 s and averaged between them. The postinjection 20-s period of peak discharge rate was compared with the corresponding baseline discharge rate.

## Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using SigmaStat software program (SigmaStat® 2.03; Statistical Software, San Jose, CA). All behavioral tests data from D1 to D35 are presented as mean  $\pm$  SD and were compared by two-way with repeated-measures ANOVA test (groups  $\times$  time). Likewise, both POST-/PRE-injection metabosensitive afferent discharge rate and POST-/PRE-injection motor reflex amplitude are compared between groups by two-way with repeated-measures ANOVA test (POST-/PRE-injection  $\times$  groups). Moreover, reflex motor baseline amplitude data are averaged and compared between groups by one-way ANOVA test. Finally, reflex motor amplitude data before and after injection (KCl-LA, 10–25 mM, 10–25 mM) are

averaged and compared within groups by Student's *t*-test (as well as for metabosensitive afferent discharge rate). *Post hoc* comparisons were performed with Student–Newman–Keuls multiple posttest comparisons. Results were considered statistically significant if the *P* value fell below 0.05.

## RESULTS

Excessive anterior displacement of the tibia was clearly observed immediately after the ACL rupture for all rats (as seen in Fig. 1C). No excessive posterior displacement of the tibia was also found for these animals (that may indicate no damage of the posterior cruciate ligament). Any kind of excessive tibia displacement was observed for all SHAM animals.

### Behavioral tests

No significant difference was observed from PRE to D35 between Control and SHAM groups for the different behavioral tests.

**The ladder-climbing test.** Our results indicated that the injured animals missed more frequently the rungs with their left hindlimb. No recovery was observed during the first 35 d. Indeed, the successful score for ACL-5wk group significantly ( $P < 0.001$ ) declined from D1 to D35 ( $0.60 \pm 0.15$ ;  $0.59 \pm 0.08$ ;  $0.61 \pm 0.11$ ;  $0.58 \pm 0.10$ ;  $0.55 \pm 0.08$ ;  $0.58 \pm 0.08$ ;  $0.53 \pm 0.07$ ;  $0.56 \pm 0.07$ ;  $0.58 \pm 0.06$ , respectively) compared with PRE ( $0.84 \pm 0.05$ ) (Fig. 3).

The successful score was significantly ( $P < 0.001$ ) lower for ACL-5wk group compared with control and SHAM-5wk groups from D1 to D35.

**DWB. LF weight-bearing.** The LF supported more importantly the weight in static condition after ACL injury. Indeed, the weight-bearing by LF significantly increased after ACL injury at D2 ( $18.2\% \pm 2.3\%$ ;  $P < 0.05$ ) and D5 ( $18.6\% \pm 3.8\%$ ;  $P < 0.05$ ) compared with PRE ( $12.5\% \pm 2.9\%$ ), and then returned to baseline values from D7 (Fig. 4A). Moreover, the LF weight-bearing (normalized by total weight) of ACL-5wk group was significantly higher than that in control and SHAM-5wk groups at D2 ( $P < 0.05$ ), D3 ( $P < 0.05$ ), D5 ( $P < 0.001$ ), and D28 ( $P < 0.05$ ), and also, at D14 compared with control group only ( $P < 0.05$ ).

**RF weight-bearing.** The RF weight-bearing of ACL-5wk group was significantly ( $P < 0.01$ ) higher than the one in control and SHAM-5wk groups at D5. No difference was observed within groups (Fig. 4B).

**LH weight-bearing.** The left hindlimb supported less weight in static conditions after ACL injury. Indeed, the weight-bearing by this paw significantly ( $P < 0.01$ ) decreased from D1 to D21 ( $20.7\% \pm 6.1\%$ ,  $20.5\% \pm 5.0\%$ ,  $23.7\% \pm 5.7\%$ ,  $18.2\% \pm 5.0\%$ ,  $21.7\% \pm 4.3\%$ ,  $18.6\% \pm 7.3\%$ ,  $19.7\% \pm 3.1\%$ , respectively) compared with PRE ( $34.8\% \pm 5.8\%$ ), then returned to baseline value (Fig. 4C). Moreover, the LH weight-bearing of ACL-5wk group was significantly lower than that in control and SHAM-5wk groups from D1 to D21 ( $P < 0.001$ ), and also at D28 compared with SHAM-5wk group only ( $P < 0.001$ ).

**RH weight-bearing.** The right hindlimb supported more weight in static conditions after ACL injury. Indeed, the weight-bearing by this paw significantly ( $P < 0.01$ ) increased from D14 to D21 ( $52.4\% \pm 5.2\%$ ,  $53.8\% \pm 5.5\%$ , respectively) compared with PRE ( $38.4\% \pm 7.6\%$ ), then returned to

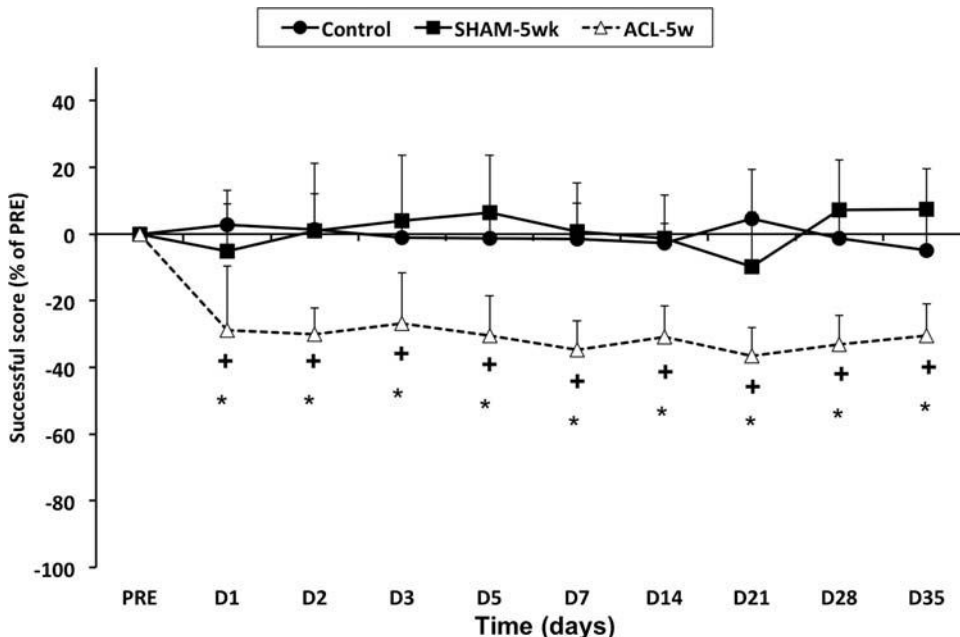


FIGURE 3—Ladder climbing test. Successful score was expressed in percent of PRE. \*Successful score decrease between PRE- and from D1 to D35 for ACL-5wk group ( $P < 0.001$ ). +Successful score decrease for ACL-5wk group compared to control and SHAM-5wk groups from D1 to D35 ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ ).

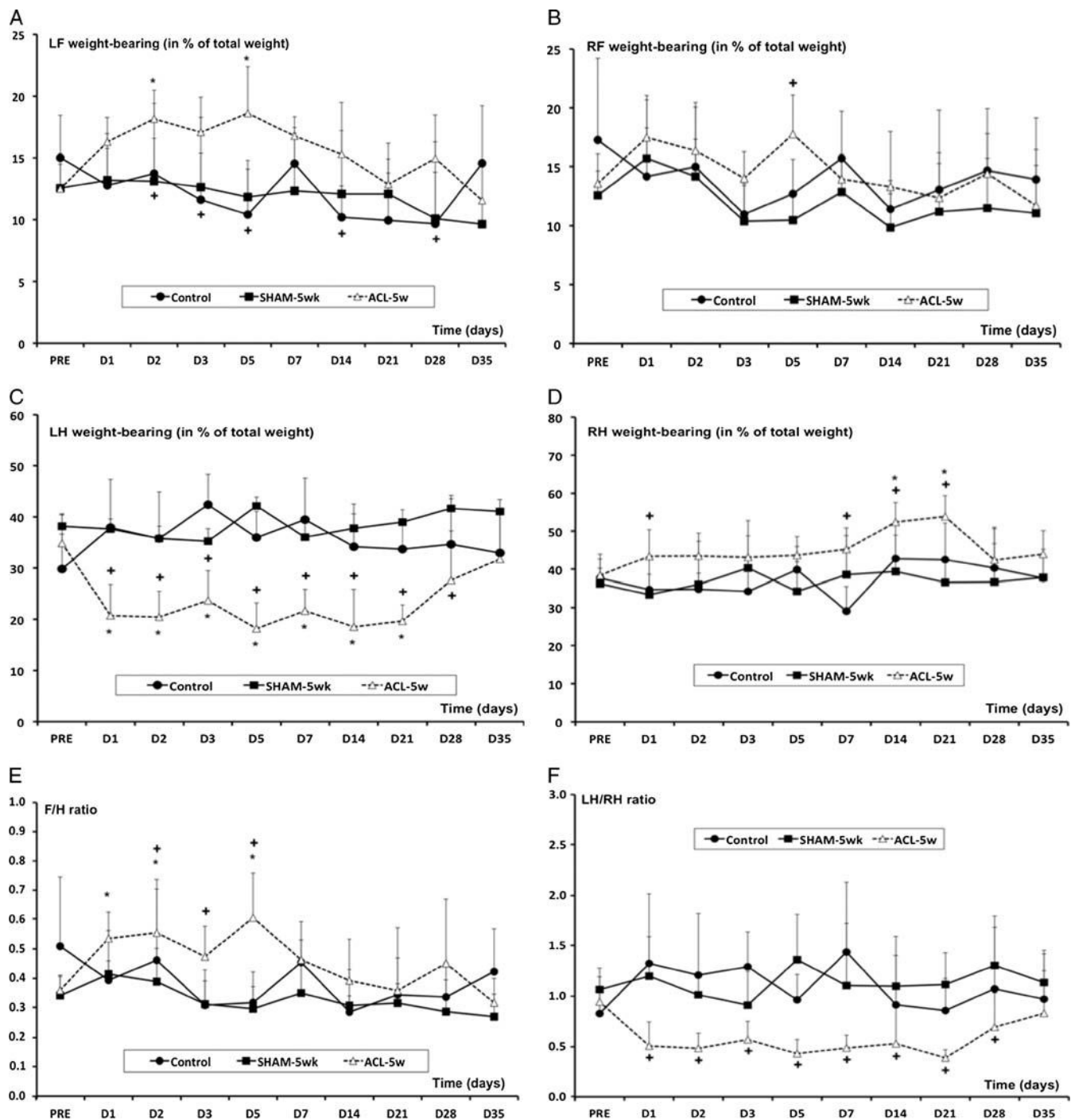


FIGURE 4—DWB test (A). LF weight-bearing, (B) RF weight-bearing, (C) LH weight-bearing, and (D) RH weight-bearing. These results are expressed in percent of total weight \*Decrease of paw weight-bearing between PRE- and from D1 to D35 for ACL-5wk group ( $P < 0.001$ ). +Decrease of paw weight-bearing for ACL-5wk compared to control and SHAM-5wk from D1 to D35 ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ ). E, F/H ratio. \*Decrease of F/H ratio between PRE and from D1 to D35 for ACL-5wk ( $P < 0.001$ ). +Decrease of F/H ratio for ACL-5wk compared with control and SHAM-5wk from D1 to D35 ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ ). F, LH/RH ratio corresponds to the ratio between left and right hindlimb weight-bearing. +Decrease of LH/RH ratio, for ACL-5wk group compared with control and SHAM-5wk groups from D1 to D35 ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$ ).

baseline values (Fig. 4D). Moreover, the RH weight-bearing of ACL-5wk group was significantly higher than that in the control and SHAM-5wk groups at D1 ( $P < 0.05$ ), D14 ( $P < 0.05$ ), and D21 ( $P < 0.01$ ), and also, at D7 compared with control group only ( $P < 0.001$ ).

**F/H ratio.** Our results showed that the weight-bearing was higher distributed on forelimbs during the first 5 d after ACL transection and returned to baseline values from D7 to D35. Indeed, F/H ratio of the ACL-5wk group significantly increased at D1 ( $0.53 \pm 0.09\%$ ;  $P < 0.05$ ), D2 ( $0.55 \pm$

0.15%;  $P < 0.05$ ), and D5 ( $0.60\% \pm 0.15\%$ ;  $P < 0.001$ ) compared with PRE ( $0.36\% \pm 0.05\%$ ), and then recovered (Fig. 4E). Moreover, F/H ratio of ACL-5wk group was higher than that in control and SHAM-5wk groups at D3 ( $P < 0.05$ ) and D5 ( $P < 0.001$ ), and also, at D2, compared with SHAM-5wk group only ( $P < 0.05$ ).

**LF/RH ratio.** No significant difference was observed for LF/RH ratio in all groups (data not shown).

**LH/RH ratio.** The left hindlimb supported less weight than the right hindlimb after ACL injury in static condition. Indeed, the ACL-5wk LH/RH ratio was significantly lower than that in control and SHAM-5wk groups from D1 and D28 ( $P < 0.05$ ), except for D3 where the ratio was only significantly lower than that in control group ( $P < 0.01$ ) and at D14 and D28 where the ratio was only significantly lower than that in SHAM-5wk group ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4F).

**Kinematic analysis of locomotor activity.** Maximum and minimum knee angles during stance and swing phases were not changed from PRE to D35 between groups at  $15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  as well as  $30 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  (data not shown). In addition, no significant difference was observed for the gait cycle and stance phase duration at  $15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $30 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  between groups (data not shown). However, the duration of the swing phase at  $15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  was higher at D1 for the ACL-5wk group compared with the control group ( $P < 0.01$ ) and with control and SHAM-5wk groups at D2 ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively) (Table 1). Then, no difference was observed until D35. The duration of the swing phase at  $30 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  was higher for the ACL-5wk group compared with both control and SHAM-5wk groups at D1 ( $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively) and D2 ( $P < 0.001$  and  $P < 0.01$ , respectively) (Table 1). Then, no difference was observed until D35. Moreover, we found a significant increase of swing phase duration at  $30 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  for ACL-5wk group between PRE and D2 ( $P < 0.01$ ).

## Electrophysiology

**Motor reflex evoked before and after KCl-LA injection. Amplitude of quadriceps motor reflex.** The

maximal amplitude of electrically evoked motor reflex was significantly ( $P < 0.01$ ) higher for ACL-1wk group ( $7.1 \pm 2.6 \text{ mV}$ ) compared with the other groups (control,  $2.8 \pm 0.9 \text{ mV}$ ; SHAM-1wk,  $3.8 \pm 3.3 \text{ mV}$ ; SHAM-5wk,  $3.6 \pm 2.9 \text{ mV}$ ; ACL-5wk,  $4.7 \pm 2.4 \text{ mV}$ ) (Fig. 5A).

**Response of motor reflex after a 10- to 25-mM KCl-LA injection.** Significant decrease of motor reflex amplitude was found after this injection for control, SHAM-1wk, and SHAM-5wk groups compared with PRE ( $P < 0.05$ ) (Fig. 5B). However, the evoked motor reflex did not respond significantly to KCl-LA injection for injured animals (ACL-1wk and ACL-5wk groups). Moreover, there was no significant change of motor reflex amplitude after a KCl-LA 10–25 mM injection between control (POST-/PRE-injection,  $0.8\% \pm 0.2\%$ ;  $-17.7\% \pm 20.8\%$ ), SHAM-1wk (POST-/PRE-injection,  $0.76\% \pm 0.13\%$ ;  $-21.0\% \pm 12.1\%$ ), and SHAM-5wk groups (POST-/PRE-injection,  $0.73\% \pm 0.11\%$ ;  $-27.0\% \pm 11.2\%$ ). No difference was observed between ACL-1wk and ACL-5wk groups.

**Metabosensitive afferents response after KCl-LA injections.** No difference was found for the response of groups III and IV afferents between groups after combinations of KCl-LA intra-arterial injections (data not shown).

## DISCUSSION

**Methodological considerations.** The similar results between SHAM and control groups indicated that surgery without transecting the ACL has a low influence on the measured parameters. It was found that SHAM surgery induced a very slight knee inflammation (compared with ACL transection) which persisted for 3 d postsurgery and largely resolved in 7 d (3). The observed changes for the injured animals were thus mainly associated with the ACL rupture in our study. In addition, the stability of behavioral results over a 5-wk period for SHAM and control groups indicated that these tests are reliable and reproducible.

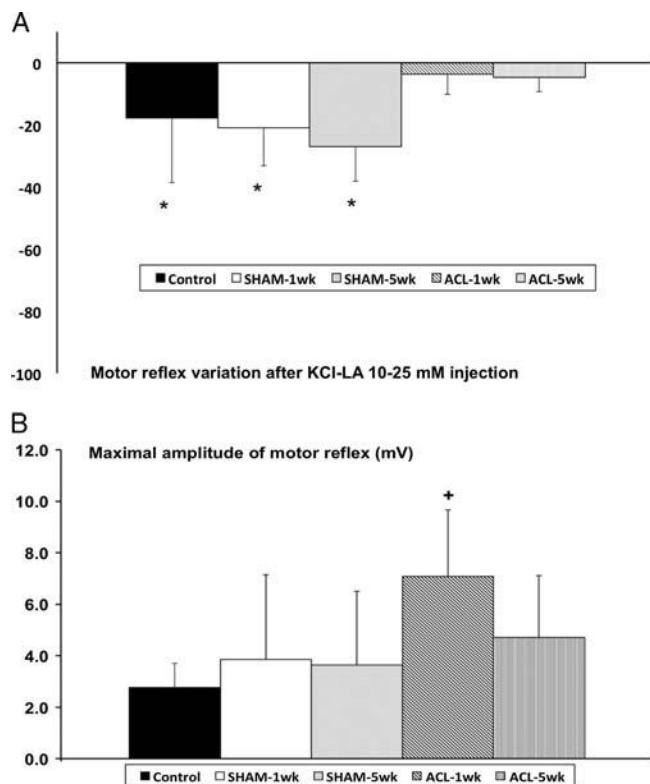
The use of a quadruped model for the study of an unstable joint may introduce a bias in extrapolating these data to bipeds.

TABLE 1. Duration (in seconds) of both the swing phase at  $15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  and the stance phase at  $30 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  while running on treadmill.

Duration of the Stance Phase ( $15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ )										
	PRE	D1	D2	D3	D5	D7	D14	D21	D28	D35
Control	0.1	0.15	0.15	0.16	0.16	0.17	0.16	0.16	0.15	0.16
SD	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03
SHAM-5wk	0.2	0.16	0.15	0.17	0.18	0.17	0.17	0.19	0.21	0.17
SD	0.03	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01
ACL-5wk	0.2	0.18	0.18 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.16	0.15	0.16	0.17	0.19	0.17
SD	0.02	0.03	0.03	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02
Duration of the Swing Phase ( $30 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ )										
	PRE	D1	D2	D3	D5	D7	D14	D21	D28	D35
Control	0.1	0.11	0.13	0.13	0.13	0.13	0.12	0.12	0.12	0.13
SD	0.01	0.04	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
SHAM-5wk	0.1	0.13	0.13	0.13	0.12	0.13	0.14	0.13	0.15	0.14
SD	0.00	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01
ACL-5wk	0.1	0.15	0.16 <sup>a,b</sup>	0.15 <sup>a</sup>	0.14	0.12	0.13	0.13	0.13	0.13
SD	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.02

<sup>a</sup>Significant increase of swing phase at  $15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  and  $30 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  for the ACL group compared with other groups.

<sup>b</sup>Significant increase of swing phase at  $30 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  for ACL group between PRE and D2.



**FIGURE 5—Motor reflex.** A, Motor reflex amplitude changes. +Significant increase of maximal amplitude of motor reflex for ACL-1wk compared with control, SHAM-1wk, SHAM-5wk, and ACL-5wk groups ( $P < 0.01$ ). B, Motor reflex amplitude after a KCl-LA 10–25 mM injection (PRE-/POST-injection ratio; %): \*Decrease of motor reflex amplitude between PRE- and POST-injection for control, SHAM-1wk, and SHAM-5wk groups ( $P < 0.05$ ).

Nevertheless, this model was validated by several authors to mimic some functional deficit features. The mechanism of reflex regulation investigated in the present study could not be easily investigated in humans. However, quadruped models show some similarity with humans in regard to motor reflex regulation and enable to study neuromuscular mechanisms. ACL rupture in rats seems thus validated and reproducible for physiopathological approach in experimental ACL injury. Moreover, the weight-bearing measurement could show us the presence or not of a behavioral/postural adaptations and the severity of functional deficits after ACL injury. It could also help to investigate the effectiveness of a rehabilitation program on postural adaptations (in further studies).

In addition, it is interesting to note that the used method to evoke motor reflex at the dorsal root is considered here to be more appropriate than the Hoffman reflex (H-reflex) measurement. Indeed, the dorsal root stimulation abolished (or strongly decreased) the antidromic wave, which could block a part of the information originating from the reflex pathway (40). Therefore, the majority of depolarized axons by the electrical dorsal root stimulation were sensitive.

Moreover, some evidence indicated that recording conditions of evoked motor reflex at the dorsal root were similar for each animal: 1) motor reflex wave gradually increased

with stimulation intensity until maximal wave was observed, 2) the latency of reflex wave is similar from one animal to another ( $3 \pm 1$  ms), 3) the amplitude of reflex wave was completely abolished when dorsal root was sectioned at the proximal level during reflex recording (it was not the case when the section was performed at the proximal level of the corresponding ventral root), and 4) quadriceps muscle contraction also disappeared after dorsal root section (contrary to ventral root section).

Other evidence showed that motor reflex changes after chemical injections were well associated with metabosensitive muscle-afferent fibers: 1) maximal amplitude of reflex wave was not modified throughout the reflex recording (100 s) when no injection was performed or when saline (same volume, 0.5 mL) was injected instead of chemical activators; 2) the injection of the KCl-LA combination did not change the amplitude of  $M_{max}$  wave, suggesting that the injection did not affect the propagation of motor potentials on muscle membrane, and thus, the reflex amplitude. Consequently, it seems that the motor reflex changes, observed in our study, could be related to spinal and supraspinal mechanisms affecting the motoneuronal activation (40). Moreover, it was recently demonstrated that the combination of chemical activators was more efficient to activate the metabosensitive afferent fibers (17). Indeed, the sum of stimuli, applied separately, induced a lower discharge than the combination of stimuli, which amplified the response of muscle afferents.

**The ACL rupture induced postural and sensori-motor deficits in 5 wk.** The injured animals showed difficulties to properly reach the rungs of the inclined ladder with the left hindlimb, and no sign of functional recovery was observed in 5 wk. Several factors may explain this phenomenon, such as propulsion deficit, coordination, and/or proprioceptive alterations of the left hindlimb. In this study, we suggested that ACL transection-induced proprioceptive deficits might partially explain our ladder results. Indeed, a previous cat study showed that proprioceptive information was strongly disturbed after ACL rupture (2). Authors found that the information which originated from secondary articular stabilizers to the sectioned ACL could not be enough to ensure a motor control adjustment for stabilizing the knee. In human, it was also found that there is a decrease in the ability to perform static and dynamic motor tasks, suggesting an impairment of motor control (39). It was the first time that the fine motor control deficits were quantified after ACL injury in rats.

To the best of our knowledge, the weight-bearing distribution was never directly measured after ligament injury in rats. In our study, the weight transfer from hindlimbs to forelimbs could be mainly associated with an increase of the left forelimb weight-bearing, which seemed to compensate the decrease of the left hindlimb weight-bearing. Moreover, these postural changes rapidly evolved. Indeed, the increased forelimb weight-bearing was not observed anymore at the end of the first week, whereas postural changes observed at the left hindlimb were maintained for 4 wk. It was in accordance

with previous work in cats, where the injured left hindlimb exerted less force to support the body weight (6).

Impairment of locomotor kinematic after ACL injury remains highly controversial in literature. In our study, the kinematic analysis of both walking and running was unchanged after ACL injury which was in agreement with several other human studies (19,24,33). Indeed, these authors did not observe changes of the locomotor pattern at different running velocities in patients with ACL injury without reconstruction. However, other authors found an impairment of the stance phase during leg extension (14,37). In addition, the locomotor activity pattern was less controversial from EMG data because numerous studies have shown an EMG activity alteration of both the quadriceps and hamstrings, mainly at high running velocity (1,18,22,36). Consequently, it seems that compensatory neuromuscular mechanisms might hide potent kinematic deficits during locomotion. In addition, we found an acute increase of the swing phase duration after ACL transection. Such result is surprising because this modification was not accompanied by a change of the stance phase duration. However, it seems that compensatory mechanisms evolved in short periods because values returned to baseline at D3. Unfortunately, there is no similar result in literature concerning the outcomes of ACL injury on locomotor pattern in rats. Future studies on locomotor activity (EMG analysis) might explain such result.

**Maximal amplitude of motor reflex was increased and regulation of motor reflex from metabosensitive afferents was disturbed after ACL injury.** The increase of motor reflex amplitude was associated with an increase of the motor unit recruitment from activation of large muscle afferents. This motor unit recruitment by reflex pathway could be regulated by several excitatory and inhibitory projections originating from the homonymous muscle, and also from antagonist muscles, skin, joint, and supraspinal motor centers (11). In our study, the increase of maximal motor reflex amplitude for injured animals suggested that the ACL rupture might induce a decrease of the inhibitory effect of motoneuronal recruitment originating from reflex pathway (mainly mediated by group Ia afferents). Therefore, the  $\alpha$ -motoneuron activation by Ia afferents might be facilitated after ACL rupture. Our result was in contradiction with the study of Rosenthal et al. (25) who showed that quadriceps H-reflex was not changed by ligament rupture. However, there were several methodological differences that could explain such opposite results: 1) human model versus animal model, 2) the motor reflex was not evoked in the same way (stimulation of dorsal root vs transcutaneous peripheral nerve), and 3) measurements were performed after ACL reconstruction in the Rosenthal and colleagues' study. To explain the observed facilitation phenomenon, we need to take into account the action of articular afferents that could induce a decrease of motor reflex activity (16,30). Given that the ACL was sectioned, the loss of inhibitory sensitive information originating from this ligament might facilitate the  $\alpha$ -motoneuron

activation (29). To reinforce this assumption, several authors have also found a modification of quadriceps and soleus H-reflex after an intra-articular lidocaine infusion inhibiting the articular sensory information (8). We suggested that the articular afferent impairments might contribute to the observed motor reflex changes.

We have also measured the regulation of motor reflex induced by metabosensitive afferent fibers. Our results demonstrated that the inhibitory effect of metabosensitive afferents was decreased after ACL rupture. In other words, the motor reflex was less inhibited by these muscle afferents. This result was in accordance to a previous study in which the MCL rupture induced an alteration of the H-reflex response after KCl injection (16). The disturbance of ligament/articular afferents might again be partially involved in such result. Indeed, it was demonstrated in cats that articular afferents could alter the groups III and IV's muscle afferent activity (28). We can thus suggest that the action of metabosensitive muscle afferents at the spinal level might be altered by the impairment of articular afferent information.

The decrease of the inhibitory action of metabosensitive afferent on motor reflex could not be explained in our study by an alteration of the muscle afferent response to their specific chemical stimuli. Indeed, our results indicated that the ACL rupture did not change the discharge rate of muscle metabosensitive afferents. It thus seemed that free-nerve endings of the quadriceps stayed insensitive to the ACL rupture. This result was in contradiction to a previous study in which the MCL rupture could alter the response of metabosensitive afferents (16). It might be explained by the fact that the sectioned ligament was not the same (MCL vs ACL), and the afferent response was not recorded with the same method (at the dorsal root vs entire nerve).

## CONCLUSIONS

Results of the present study may contribute in explaining motor activation impairments of the knee surrounding muscles after ACL rupture. Indeed, it was underlined that the metabosensitive feedback did not exert the same inhibitory action on spinal motor reflex without modification of the metabosensitive response to specific activators. Moreover, we observed that functional deficits could be maintained for several weeks. It might be necessary to deepen the neuromuscular influence of ACL injury by focusing on hamstring muscles given that this muscle group plays an important role in the articular stability during movements.

This work was supported by funding from *Aix-Marseille Université* (AMU) and the *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS). We are grateful to Thelma COYLE for her help in Matlab data analysis. The authors are also grateful to Alain DONNEAUD and Maxime BONNET for technical support.

No author received funding from any kind of organizations for this work. Each author of the present review declared no conflict of interest.

The results of the present study do not constitute endorsement by ACSM.

## REFERENCES

- Boerboom AL, Hof AL, Halbertsma JP, et al. Atypical hamstrings electromyographic activity as a compensatory mechanism in anterior cruciate ligament deficiency. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2001;9(4):211–6.
- Bonsfills N, Gomez-Barrena E, Raygoza JJ, Núñez A. Loss of neuromuscular control related to motion in the acutely ACL-injured knee: an experimental study. *Eur J Appl Physiol.* 2008;104(3):567–77.
- Bove SE, Laemont KD, Brooker RM, et al. Surgically induced osteoarthritis in the rat results in the development of both osteoarthritis-like joint pain and secondary hyperalgesia. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(10):1041–8.
- Gandevia SC. Spinal and supraspinal factors in human muscle fatigue. *Physiol Rev.* 2001;81(4):1725–89.
- Hanna RL, Kaufman MP. Activation of thin-fiber muscle afferents by a P2X agonist in cats. *J Appl Physiol (1985).* 2004;96(3):1166–9.
- Hasler EM, Herzog W, Leonard TR, Stano A, Nguyen H. In vivo knee joint loading and kinematics before and after ACL transection in an animal model. *J Biomech.* 1998;31(3):253–62.
- Hertel J. Functional anatomy, pathomechanics, and pathophysiology of lateral ankle instability. *J Athl Train.* 2002;37(4):364–75.
- Hopkins JT, Ingersoll CD, Krause BA, Edwards JE, Cordova ML. Effect of knee joint effusion on quadriceps and soleus motoneuron pool excitability. *Med Sci Sports Exerc.* 2001;33(1):123–6.
- Ingersoll CD, Grindstaff TL, Pietrosimone BG, Hart JM. Neuromuscular consequences of anterior cruciate ligament injury. *Clin Sports Med.* 2008;27(3):383–404, vii.
- Irie K, Uchiyama E, Iwaso H. Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee.* 2003;10(1):93–6.
- Knikou M. The H-reflex as a probe: pathways and pitfalls. *J Neurosci Methods.* 2008;171(1):1–12.
- Konishi Y, Fukubayashi T, Takeshita D. Mechanism of quadriceps femoris muscle weakness in patients with anterior cruciate ligament reconstruction. *Scand J Med Sci Sports.* 2002;12(6):371–5.
- Krogsgaard MR, Dyhre-Poulsen P, Fischer-Rasmussen T. Cruciate ligament reflexes. *J Electromyogr Kinesiol.* 2002;12(3):177–82.
- Lange GW, Hintermeister RA, Schlegel T, Dillman CJ, Steadman JR. Electromyographic and kinematic analysis of graded treadmill walking and the implications for knee rehabilitation. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1996;23(5):294–301.
- Laurin J, Dousset E, Mesure S, Decherchi P. Neuromuscular recovery pattern after medial collateral ligament disruption in rats. *J Appl Physiol (1985).* 2009;107(1):98–104.
- Laurin J, Dousset E, Mesure S, Decherchi P. Neuromuscular recovery after medial collateral ligament disruption and eccentric rehabilitation program. *Med Sci Sports Exerc.* 2011;43(6):1032–41.
- Light AR, Huguen RW, Zhang J, Rainier J, Liu Z, Lee J. Dorsal root ganglion neurons innervating skeletal muscle respond to physiological combinations of protons, ATP, and lactate mediated by ASIC, P2X, and TRPV1. *J Neurophysiol.* 2008;100(3):1184–201.
- Limbird TJ, Shiavi R, Frazer M, Borra H. EMG profiles of knee joint musculature during walking: changes induced by anterior cruciate ligament deficiency. *J Orthop Res.* 1988;6(5):630–8.
- Lindström M, Felländer-Tsai L, Wredmark T, Henriksson M. Adaptations of gait and muscle activation in chronic ACL deficiency. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010;18(1):106–14.
- Melnyk M, Faist M, Gothner M, Claes L, Friemert B. Changes in stretch reflex excitability are related to “giving way” symptoms in patients with anterior cruciate ligament rupture. *J Neurophysiol.* 2007;97(1):474–80.
- Metz GA, Whishaw IQ. The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. *J Vis Exp.* 2009;(28):pii: 1204.
- Papadonikolakis A, Cooper L, Stergiou N, Georgoulis AD, Soucacos PN. Compensatory mechanisms in anterior cruciate ligament deficiency. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2003;11(4):235–43.
- Pertici V, Pin-Barre C, Felix MS, Laurin J, Brisswalter J, Decherchi P. A new method to assess weight-bearing distribution after central nervous system lesions in rats. *Behav Brain Res.* 2014;259:78–84.
- Robert H, Bonnard C. The possibilities of using the patellar tendon in the treatment of anterior cruciate ligament tears in children. *Arthroscopy.* 1999;15(1):73–6.
- Rosenthal MD, Moore JH, Stoneman PD, DeBerardino TM. Neuromuscular excitability changes in the vastus medialis following anterior cruciate ligament reconstruction. *Electromyogr Clin Neurophysiol.* 2009;49(1):43–51.
- Rotto DM, Kaufman MP. Effect of metabolic products of muscular contraction on discharge of group III and IV afferents. *J Appl Physiol (1985).* 1988;64(6):2306–13.
- Rybicki KJ, Waldrop TG, Kaufman MP. Increasing gracilis muscle interstitial potassium concentrations stimulate group III and IV afferents. *J Appl Physiol (1985).* 1985;58(3):936–41.
- Schomburg ED, Steffens H, Kniffki KD. Contribution of group III and IV muscle afferents to multisensory spinal motor control in cats. *Neurosci Res.* 1999;33(3):195–206.
- Sjölander P, Johansson H, Djupsjöbacka M. Spinal and supraspinal effects of activity in ligament afferents. *J Electromyogr Kinesiol.* 2002;12(3):167–76.
- Solomonow M. Sensory-motor control of ligaments and associated neuromuscular disorders. *J Electromyogr Kinesiol.* 2006;16(6):549–67.
- Song C, Zhong GB, Liu ZD, Li W, Ni PW, Qiao ZG. Effective reinnervation of the quadriceps femoris by spinal ventral root cross-anastomosis in rats. *Acta Cir Bras.* 2012;27(5):330–7.
- Spindler KP, Wright RW. Clinical practice. Anterior cruciate ligament tear. *N Engl J Med.* 2008;359(20):2135–42.
- Stergiou N, Moraiti C, Giakas G, Ristanis S, Georgoulis AD. The effect of the walking speed on the stability of the anterior cruciate ligament deficient knee. *Clin Biomech (Bristol, Avon).* 2004;19(9):957–63.
- Tetreault P, Dansereau MA, Doré-Savard L, Beaudet N, Saret P. Weight bearing evaluation in inflammatory, neuropathic and cancer chronic pain in freely moving rats. *Physiol Behav.* 2011;104(3):495–502.
- Valeriani M, Restuccia D, Di Lazzaro V, Franceschi F, Fabbriani C, Tonali P. Central nervous system modifications in patients with lesion of the anterior cruciate ligament of the knee. *Brain.* 1996;119(Pt 5):1751–62.
- van Lent ME, Drost MR, vd Wildenberg FA. EMG profiles of ACL-deficient patients during walking: the influence of mild fatigue. *Int J Sports Med.* 1994;15(8):508–14.
- Waite JC, Beard DJ, Dodd CA, Murray DW, Gill HS. In vivo kinematics of the ACL-deficient limb during running and cutting. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2005;13(5):377–84.
- Wang Y, Yang L, Zhang J, et al. Differential MMP-2 activity induced by mechanical compression and inflammatory factors in human synovial cells. *Mol Cell Biomech.* 2010;7(2):105–14.
- Williams GN, Barrance PJ, Snyder-Mackler L, Buchanan TS. Altered quadriceps control in people with anterior cruciate ligament deficiency. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36(7):1089–97.
- Zehr EP. Considerations for use of the Hoffmann reflex in exercise studies. *Eur J Appl Physiol.* 2002;86(6):455–68.



# Annexe 3

Publication acceptée dans une revue non-indexée dans le JCR  
au cours de ce travail de thèse :

- Physiological Adaptations Following Endurance Exercises after Stroke: Focus on the Plausible Role of High-Intensity Interval Training. *International Journal of Physical Medicine & Rehabilitation*. s3. doi:10.4172/2329-9096.S3-006. (2014).  
**PIN-BARRE, C & LAURIN, J.**

Article soumis dans une revue dans le JCR au cours de ce  
travail de thèse :

- High- versus moderate-intensity training on neuroplasticity and functional parameters after focal ischemia.  
**PIN-BARRE C, CONSTANS A, DECHERCHI P, BRISSWALTER J, PELLEGRINO C, LAURIN J**



## Physiological Adaptations Following Endurance Exercises after Stroke: Focus on the Plausible Role of High-Intensity Interval Training

Jerome Laurin<sup>1\*</sup> and Caroline Pin-Barre<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Aix Marseille Université, CNRS, ISM UMR 7287, 13288, Marseille, France

<sup>2</sup>Univ. Nice Sophia Antipolis, Univ. Sud Toulon-Var, LAMHESS, UPRES EA 6309, 06204, Nice, France

\*Corresponding author: Jerome Laurin, Aix-Marseille Université (AMU) and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 7287, Institut des Sciences du Mouvement : Etienne-Jules MAREY, Equipe, Plasticité des Systèmes Nerveux et Musculaire, Faculté des Sciences du Sport, CC910 - 163, avenue de Luminy, F-13288 Marseille cedex 09, France, Tel: +33 (0)4-91-82-84-11; E-mail: [jerome.laurin@univ-amu.fr](mailto:jerome.laurin@univ-amu.fr)

Rec date: 20 Jan 2014; Acc date: 24 Feb 2014; Pub date: 27 Feb 2014

Copyright: © 2014 Laurin J, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### Abstract

The endurance training is considered as an integral part of stroke rehabilitation. However, medical institutions did not systematically include aerobic exercises because of the lack of scientific evidence. It is mainly the case for high-intensity interval training (HIT) for which very few experiments were focused on after stroke. This review was designed to examine and compare the neurophysiological and physiological adaptations associated with two effective modalities of endurance training after stroke: the continuous low-intensity endurance training and the HIT. Based on the beneficial adaptations induced by HIT in healthy people and in patients with cardiovascular disorders, we postulate that this training modality might be involved in endurance program as complement or alternate of the traditional low intensity training in stroke patient. Therefore, including HIT in stroke rehabilitation may improve functional recovery by inducing rapid and significant beneficial physiological adaptations. Moreover, no clear recommendations were found on the appropriate timing for using HIT and other endurance training after stroke despite that the intervention timing is one of the major determinant of an effective recovery. The optimal time to initiate endurance program rehabilitation is thus discussed. Further studies are required to investigate the physiological adaptations to HIT compared to traditional endurance training as well as the combination of these two training modalities.

**Keywords:** Rehabilitation; Cerebral ischemia; Aerobic program; Cardiovascular fitness; Functional recovery

### Introduction

When functional rehabilitation is stopped, stroke survivors frequently preserve chronic sensorimotor dysfunctions as well as metabolic and cardiovascular complications [1]. Moreover, they are still subjected to recurrent stroke within 5 years despite optimal medical management [2]. Therefore, it is crucial that scientists and therapists continue to investigate the effectiveness of different stroke rehabilitation components in order to improve functional recovery and reduce both dependence and the economic burden associated with the lack of effective treatments.

Endurance training has been developed as part of stroke rehabilitation (and post-rehabilitation period) to prevent complications relating to prolonged inactivity, to decrease the risk of recurrent stroke and to improve cardiorespiratory fitness, muscular endurance and motor function [3,4]. However, the lack of practical and physiological evidence-based exercise recommendations put a damper on medical institutions to include such physical training in stroke rehabilitation [5,6]. To date, no optimal endurance program has currently established itself as a dominant strategy but two endurance training modalities begin to be confronted in the stroke literature: the traditional continuous low-intensity aerobic exercise and the high-intensity interval training (HIT). The latter is defined as a brief and intermittent intense exercise that is interrupted by periods of active or passive rest [7,8]. This training modality could induce greater improvements in endurance performance and associated physiological

adaptations than the traditional aerobic training in both health and disease. Over the last decade, HIT-induced physiological adaptations have been more investigated for cardiovascular diseases as heart failure or hypertension than for stroke patients. But, all the findings, discussed in this review, could give us insight on the plausible role of HIT as complement or alternate to the traditional endurance modality for stroke patient [9,10].

The purpose of the present review is to examine and compare the physiological adaptations associated with continuous low-intensity endurance training and HIT in order to clarify the benefits of these training modalities for stroke patients. Given that HIT have received little attention after cerebral ischemia, it is also necessary to use evidence from healthy adults and patients with heart disease. We will also discuss the optimal time to initiate such endurance training modalities because an effective functional recovery needs to take into account the timing of intervention.

### Continuous Low Intensity Aerobic Training Generates Beneficial Neurophysiological and Physiological Adaptations After Stroke

#### Aerobic training recommendations

Since the last decade, it has been considered that aerobic exercise should be characterized by a progressive increase of intensity from 40 to 80% of the maximum heart rate reserve (HRR) with a frequency comprised between 3 and 5 sessions/week. The duration of continuous

aerobic exercise should also be up to 20-60 min/session and is mainly performed on treadmill and/or cycle ergometer [4,11,12].

### Safety of continuous aerobic exercises

It was frequently postulated that such physical exercise could be undertaken with a high level of safety by most people including stroke survivors [11,13,14]. Nevertheless, given that physical exercise is never performed without injury risks, the potential adverse effects of exercise is minimized by appropriate screening, monitoring and patient education [11]. To date, no major adverse events were reported after the above aerobic training program [4,12]. For example, Marzolini et al. demonstrated that no serious cardiovascular events occurred during 349 cycle ergometer or treadmill continuous aerobic exercises on a 6 months period [15]. In addition, as stroke patients exhibited more or less poorer standing balance, cycle ergometer appeared to be more safe approach than treadmill exercise [12,16,17].

### Beneficial effects and physiological adaptations

Aerobic training improves the cardiorespiratory fitness, exercise tolerance to fatigue, quality of life and reduces the risk of cardiovascular disease and recurrent stroke [4]. Indeed, endurance-training programs using treadmill or cycle ergometer are now well known to induce higher peak work rate, higher walking velocity (10-m and 6-min walking tests) and improve peak oxygen consumption ( $VO_{2peak}$ ) [3,18-20]. Such aerobic training also elicits significant reduction in submaximal energy expenditure. Indeed, the steady-state  $VO_2$  is reduced by 21 % during a standardized walking treadmill task (representative of typical slow hemiparetic gait) after 12 weeks of aerobic training [21]. These findings suggest that endurance training might enable activities of daily living to be performed at a lower percentage of the aerobic capacity.

Moreover, after 10 weeks of aerobic training, stroke patients showed lower systolic blood pressure at submaximal workloads during the graded exercise test [20]. Such events may be explained by vascular adaptations following physical training. Indeed, Billinger et al. proved that aerobic training focused on single paretic limb induced an increase of the femoral artery diameter, peak blood flow velocity and thus improved muscle blood flow (+42%) [22]. Moreover, it was recently confirmed that treadmill training during 6 months increased blood flow at both paretic and non-paretic limb contrary to the effects of traditional stroke rehabilitation [23]. The same authors also indicated later that the vasomotor function could be improved at the cerebral level by measuring the middle cerebral artery blood flow velocity before and after 6-month of aerobic training [24]. However, the benefits of improved cardiovascular fitness did not systematically appear to extend to measurable change in disability and dependence functions or psychological state [25].

On a metabolic point of view, treadmill aerobic training is also known to improve glucose tolerance and insulin sensitivity that limit insulin resistance often observed in stroke patients [26].

Very few information were found on the brain activity following aerobic training. Only one study indicated that effective gait training on treadmill with body weight support, improving walking speed and endurance, was characterized by an increase of brain activity in the bilateral primary sensorimotor cortices, the cingulate motor areas, the caudate nuclei bilaterally and in the thalamus of the affected hemisphere during movement of the paretic foot [27]. In addition, improvement in sensorimotor function, assessed with the Fugl-Meyer

Index, was significantly related to the improvement in aerobic capacity [20].

Several studies using rat models of cerebral ischemia enabled to better understand the aerobic training outcomes on the infarct volume and underlying neuromuscular adaptations. Indeed, several authors indicated that endurance training reduced infarct volume during the first weeks after cerebral ischemia [28-31]. Moreover, an early and daily treadmill exercise during 1 month increased the cellular expression levels of some neurotrophic factors, promoted cell growth and neural plasticity, but also reduced the expression of apoptosis markers [28,31,32]. Others studies indicated that early endurance exercise improved blood flow in the ischemic region and promoted angiogenesis [33]. Such finding was reinforced by the fact that daily treadmill training induced an increase of GFAP expression (proteins playing a role in vascular cerebral plasticity) [32]. Furthermore, it is noteworthy to add that only 3 days of aerobic exercise reduced microvascular endothelial cells apoptosis in brain related by shear stress increase following modest improvement of cerebral blood flow [34]. In addition, the hind-limb muscle atrophy was attenuated just after 6 sessions of daily low-intensity endurance exercise in both the type I and II fiber cross-sectional area (both in affected and non-affected limbs) [35]. Moreover, it was shown that aerobic treadmill training (20min/day, during 21 days) improved cholinergic system regulation/homeostasis and it was suggested that such adaptation allowing better limb motor function [36]. The muscle electromyographic activity returned to normal activity only after 10 days of treadmill training, optimizing balance and motor coordination during locomotion [37]. Unfortunately, the underlying neuromuscular adaptations at the spinal and supraspinal levels remain poorly understood in animal as well as in human models and deserves more attention. Indeed, it is important to notice that these parameters could give important information on the quality of treatments.

### The recovery plateau may be counteracted by varying endurance-training program

A recovery plateau was mainly observed after 6 to 12 months post-stroke traditional functional rehabilitation meaning that no additional motor improvements were expected after this time period [38-40]. Given that current therapy termination decisions are predicted on the existence of such plateau, patients were discharged without recovered all their motor functions.

The exercise physiology gives us information on the way to avoid the performance stagnation and demotivation. Page et al. were the first authors to speak about periodization in stroke inspired from the athlete training [38]. If an athlete repeats the same training, a performance plateau occurs. Indeed, physical training needs to be varied in terms of training variables such as intensity, volume and type of exercise in order to induce long-term performance improvement. In accordance to Page et al., the absence of functional improvement observed in stroke patients may be avoided by changing the rehabilitation exercise characteristics. It was already shown that stroke patients who exhibited the presence of recovery plateau can show substantial motor improvement after participation in novel program requiring task-specific, repeated motor practice [41].

It seems reasonable to suppose that varying the way of performing aerobic exercises may be beneficial for stroke patients. Several authors reported that greater improvements were observed with higher exercise intensity after stroke [4,19]. For example, it was demonstrated

that chronic mild to moderate stroke patients were able to tolerate 30 to 50 minutes of training at 60% to 80% of the HRR (3x/week), which could be considered as a high-intensity aerobic treadmill exercise [18]. Such program led to an increase in  $VO_{2peak}$ , HRR, maximum walking speed on 10 m and balance. Interestingly, gains in  $VO_{2peak}$  were still higher 1 year after the end of training compared to baseline value [18]. Given that high-intensity exercises could be supported by most stroke patients, we will now argue that the HIT should be considered as a plausible effective alternate or complement to traditional low-intensity endurance training in order to avoid recovery plateau and optimize cardiorespiratory fitness and motor function after stroke.

## Including Interval-Training Exercises in Rehabilitation Program Seems to be an Effective Strategy after Stroke

### Principles of HIT exercise

The use of HIT is based on the hypothesis that higher exercise intensity optimally stimulates the oxygen transport and utilization systems and thus induces greater improvements in  $VO_{2peak}$ . For that, this endurance training modality consists to work in the high-intensity training zone in order to elicit  $VO_{2peak}$  or at least approach it at a very high percentage (85-95% of  $VO_{2peak}$ ) [42,43]. The way to enhance  $VO_{2peak}$  by using HIT is thus very different than continuous low-intensity exercise in which the intensity is frequently fixed around the ventilatory threshold [43]. Moreover, HIT offers the opportunity to combine numerous factors including intensity and duration of exercise, number of intervals (active or passive), duration of recovery and the type of exercise (running, cycling, rowing...). It thus may allow varying the physiological response to endurance exercise during stroke rehabilitation. Therefore, the use of HIT in complement with continuous submaximal exercise may enable to avoid plateau recovery often observed after stroke. In addition, HIT could be perceived to be more enjoyable than moderate-intensity continuous exercise [44]. With such endurance exercise, stroke patients may perform high endurance intensities without high psychological constraints.

### Rapid physiological adaptations following HIT program

HIT stimulates physiological remodeling comparable with moderate-intensity continuous training in healthy people despite a substantially lower time commitment (67% lower after HIT than continuous training) and reduced total exercise volume (90% lower after HIT than continuous training) [8,45-49]. For example, the HIT programs increased  $VO_{2peak}$ , compliance in peripheral arteries and improved endothelial function in the trained legs to the same extent as continuous endurance training despite a markedly reduced time commitment per session and total training volume [45,49,50]. Consequently, HIT may improve effectively the cardiorespiratory fitness of stroke patients in a shorter period of time.

### Beneficial effects of HIT for people with cardiovascular disorders

Several authors demonstrated that HIT is more effective than continuous moderate-intensity exercise training for improving quality of life and cardiovascular fitness of hypertensive patients and heart failure patients [9,51-54]. Indeed, it was found that HIT was effective on hypertensive patients, and normotensive at high familial risk for hypertension, as shown by 1) a higher increase in  $VO_{2peak}$  (36% vs. 16% after continuous moderate-intensity exercise), 2) an improvement

of endothelial function as indicated by an increase of nitric oxide (NO) release associated with higher NOx and lower endothelin-1 plasma levels, 3) a reduction in norepinephrine levels in both resting conditions, during and just after exercise, and 4) a reduction in arterial stiffness [9].

Likewise, HIT elicited the largest increases in  $VO_{2peak}$  for heart failure patients although all physical training modalities have proven to be beneficial [10,55]. Moreover, endothelial function and left ventricular morphology were improved to a greater extent following HIT compared with continuous moderate-intensity training as indicated by a decrease of systolic and diastolic blood pressure [52,54]. Authors also indicated that mitochondrial biogenesis and maximal rate of Ca<sup>2+</sup> reuptake into sarcoplasmic reticulum were higher after HIT [54]. Warburton et al. revealed that HIT also improved anaerobic tolerance to a greater importance than traditional continuous exercise modality [56]. Consequently, we can observe that HIT could act on many parameters known to determine the endurance performance and physical health of a subject.

As for healthy subjects, these beneficial adaptations were realized even though the training time commitment was much lower than traditional aerobic exercises without increasing the risk to patients [53,57,58]. If HIT is effective for patients with cardiovascular disorders, there are no reasons to believe that HIT could not be applied to stroke patients.

### Beneficial effects of HIT in stroke patients

Despite the above evidence, very few studies were focused on HIT-induced neurophysiological or physiological adaptations after stroke. HIT can induce similar or even higher changes than traditional low-intensity continuous exercise in aerobic fitness and related-physiological adaptations in stroke patients. Katz-Leurer et al. demonstrated the beneficial effect of progressive interval training on cycle ergometer during 2 weeks, following by continuous exercises during 6 weeks, on the HR at rest, workload, work time and stair climbing [5]. However, the intensity was limited to 60 % of HRR during the protocol that is considered as moderate exercise intensity. Likewise, Duncan et al. also used interval training to improve endurance abilities for stroke patients but each bout of cycling effort involved different intensities (measured as rpm, higher than lower intensities in the same cycling bout) [57]. No reasons were advanced for this strategy choice. Nevertheless, authors found higher endurance capacities associated with gains in  $VO_{2peak}$ , an increase in duration of bike exercise and distance on the 6-min walk and the 10 m gait velocity compared with traditional aerobic training [57]. As it was mentioned above, low to moderate stroke patients were able to maintain high-intensity exercise [18]. Consequently, authors have recently used higher intensities in their HIT programs. In one study, stroke patients performed HIT on treadmill (4 x 4 minutes work periods separated by 3 min of active rest; intensity: 85-95% of HR<sub>peak</sub>) during 4 weeks (5 days per week) [59]. Such HIT program induced an increase in  $VO_{2peak}$  (+11.6%) and in peak pulmonary ventilation compared to baseline values. Interestingly, the increase of  $VO_{2peak}$  was similar to that observed in other experiments after 6 months of low-moderate intensity treadmill training [3]. The increase in  $VO_{2peak}$  after HIT was assumed to be considerable from this short training intervention [59]. Given that the oxygen consumption, HR and pulmonary ventilation were lower during treadmill walking at the same submaximal intensity after HIT program, the authors also found that the walking economy was improved by such training [59]. The

reduced effort of walking post-training exhibited strong implications for everyday life energy expenditure. However, these results were not in accordance with Askim et al. who did not find a significant increase of  $VO_{2peak}$  whereas they used the same HIT characteristics during a 6 weeks training [60]. They attributed this difference by a too small sample and/or too few training sessions.

It seems important to add that  $VO_{2peak}$  measurement is crucial but not sufficient to assess the cardiorespiratory fitness of a subject. Indeed,  $VO_{2peak}$  was frequently measured for stroke patients because their baseline  $VO_{2peak}$  level was frequently below the 18 ml/kg/min that was suggested as a minimum required for independent living [4]. Other exercise parameters as the cardiac remodeling, the ventilatory threshold adaptation, the muscle mass, the anaerobic contribution to energy support, but also neuromuscular adaptations are lacking despite such information may bring us important evidence on the HIT effectiveness and the outcomes on quality of life of stroke patient.

### Timing of Endurance Training Initiation?

Although the timing of functional rehabilitation appears to be one of the critical factor determining a successful recovery, the optimal time of aerobic training initiation remains controversial [61-64]. It was found that late intervention was associated with lower discharge, lower functional outcomes and longer period of rehabilitation [62,63]. Some authors suggested that a very early rehabilitation (during the first week post-stroke) shortened the hospitalization period, improved functional outcomes, limited the deconditioning period inducing by patient immobilization and presented a low relative risk for adverse effects [61-63,65]. Animal studies reinforced this hypothesis by showing that early rehabilitation induced more important decrease in infarct volume than late intervention [66]. Moreover, some authors strongly recommended a more intense rehabilitation during the first 3 months [63]. They assumed that early and aggressive interventions should be implemented, even for severely affected stroke patients showing the most functional benefits from early rehabilitation. It is noteworthy to add that the use of cycle ergometer for performing HIT seems us to be more appropriate for stroke patients because it allows bypassing the early balance impairments that could delay the physical intervention [17]. However, the physiological-based evidence of endurance exercises effectiveness in the very early period after stroke are still lacking [17].

New advances in the understanding of the neural adaptations following stroke injury could help us to found the critical period to obtain the best recovery [67]. Functional abilities strongly decreased in the 1st to the 4th weeks after stroke suggesting important neurophysiological adaptations [61]. Indeed, there are numerous early changes at the molecular and cellular levels that increase the potential for activity driven changes in spared cerebral regions [67]. Initiating rehabilitation may be more effective during this period of only few weeks/months post-stroke where cerebral motor areas were hyperexcitable.

Given that stroke patients need to improve their functional recovery into a short window of time after stroke, we postulate that HIT with progressive increase of intensity seems appropriate during the acute phase in order to promote rapid and effective physiological adaptations observed in just few sessions.

### Conclusion

All these findings suggest that HIT appears to be promising for stroke patients. It could be assumed that this training strategy may assist or replace the traditional moderate intensity exercise in order to promote more effective and rapid physiological adaptations. However, large-scale studies in human and animal models are clearly needed to ensure that HIT is a realistic and time-efficient exercise, but also, to determine the specific and beneficial neurophysiological and physiological adaptations following HIT intervention. The comparison and the combination of these two-endurance exercise modalities need to be deepened in further studies. It is also necessary to precisely define when stroke rehabilitation incorporating HIT should commence after stroke. If achieved, HIT will probably be considered as an integral component of stroke rehabilitation.

### References

1. Broussalis E, Killer M, McCoy M, Harrer A, Trinkka E, et al. (2012) Current therapies in ischemic stroke. Part A. Recent developments in acute stroke treatment and in stroke prevention. *Drug Discov Today* 17: 296-309.
2. Ivey FM, Macko RF, Ryan AS, Hafer-Macko CE (2005) Cardiovascular health and fitness after stroke. *Top Stroke Rehabil* 12: 1-16.
3. Macko RF, Ivey FM, Forrester LW, Hanley D, Sorkin JD, et al. (2005) Treadmill exercise rehabilitation improves ambulatory function and cardiovascular fitness in patients with chronic stroke: a randomized, controlled trial. *Stroke* 36: 2206-2211.
4. Marsden DL, Dunn A, Callister R, Levi CR, Spratt NJ (2013) Characteristics of exercise training interventions to improve cardiorespiratory fitness after stroke: a systematic review with meta-analysis. *Neurorehabil Neural Repair* 27: 775-788.
5. Katz-Leurer M, Shochina M, Carmeli E, Friedlander Y (2003) The influence of early aerobic training on the functional capacity in patients with cerebrovascular accident at the subacute stage. *Arch Phys Med Rehabil* 84: 1609-1614.
6. Langhorne P, Bernhardt J, Kwakkel G (2011) Stroke rehabilitation. *Lancet* 377: 1693-1702.
7. Laursen PB, Jenkins DG (2002) The scientific basis for high-intensity interval training: optimising training programmes and maximising performance in highly trained endurance athletes. *Sports Med* 32: 53-73.
8. Gibala MJ, Little JP, Macdonald MJ, Hawley JA (2012) Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J Physiol* 590: 1077-1084.
9. Ciolac EG (2012) High-intensity interval training and hypertension: maximizing the benefits of exercise? *Am J Cardiovasc Dis* 2: 102-110.
10. Smart NA (2013) How do cardiorespiratory fitness improvements vary with physical training modality in heart failure patients? A quantitative guide. *Exp Clin Cardiol* 18: e21-25.
11. Gordon NF, Gulanick M, Costa F, Fletcher G, Franklin BA, et al. (2004) Physical activity and exercise recommendations for stroke survivors: an American Heart Association scientific statement from the Council on Clinical Cardiology, Subcommittee on Exercise, Cardiac Rehabilitation, and Prevention; the Council on Cardiovascular Nursing; the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; and the Stroke Council. *Circulation* 109: 2031-2041.
12. Pang MY, Charlesworth SA, Lau RW, Chung RC (2013) Using aerobic exercise to improve health outcomes and quality of life in stroke: evidence-based exercise prescription recommendations. *Cerebrovasc Dis* 35: 7-22.
13. Rimmer JH, Wang E (2005) Aerobic exercise training in stroke survivors. *Top Stroke Rehabil* 12: 17-30.
14. Tang A, Sibley KM, Thomas SG, Bayley MT, Richardson D, et al. (2009) Effects of an aerobic exercise program on aerobic capacity,

- spatiotemporal gait parameters, and functional capacity in subacute stroke. *Neurorehabil Neural Repair* 23: 398-406.
15. Marzolini S, Oh PI, Brooks D (2012) Effect of combined aerobic and resistance training versus aerobic training alone in individuals with coronary artery disease: a meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol* 19: 81-94.
  16. Pang MY, Eng JJ, Dawson AS, Gylfadóttir S (2006) The use of aerobic exercise training in improving aerobic capacity in individuals with stroke: a meta-analysis. *Clin Rehabil* 20: 97-111.
  17. Stoller O, de Bruin ED, Knols RH, Hunt KJ (2012) Effects of cardiovascular exercise early after stroke: systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol* 12: 45.
  18. Globas C, Lam JM, Zhang W, Imanbayev A, Hertler B, et al. (2011) Mesencephalic corticospinal atrophy predicts baseline deficit but not response to unilateral or bilateral arm training in chronic stroke. *Neurorehabil Neural Repair* 25: 81-87.
  19. Lam JM, Globas C, Cerny J, Hertler B, Uludag K, et al. (2010) Predictors of response to treadmill exercise in stroke survivors. *Neurorehabil Neural Repair* 24: 567-574.
  20. Potempa K, Lopez M, Braun LT, Szidon JP, Fogg L, et al. (1995) Physiological outcomes of aerobic exercise training in hemiparetic stroke patients. *Stroke* 26: 101-105.
  21. Macko RF, DeSouza CA, Tretter LD, Silver KH, Smith GV, et al. (1997) Treadmill aerobic exercise training reduces the energy expenditure and cardiovascular demands of hemiparetic gait in chronic stroke patients. A preliminary report. *Stroke* 28: 326-330.
  22. Billinger SA, Gajewski BJ, Guo LX, Kluding PM (2009) Single limb exercise induces femoral artery remodeling and improves blood flow in the hemiparetic leg poststroke. *Stroke* 40: 3086-3090.
  23. Ivey FM, Hafer-Macko CE, Ryan AS, Macko RF (2010) Impaired leg vasodilatory function after stroke: adaptations with treadmill exercise training. *Stroke* 41: 2913-2917.
  24. Ivey FM, Ryan AS, Hafer-Macko CE, Macko RF (2011) Improved cerebral vasomotor reactivity after exercise training in hemiparetic stroke survivors. *Stroke* 42: 1994-2000.
  25. Bateman A, Culpan FJ, Pickering AD, Powell JH, Scott OM, et al. (2001) The effect of aerobic training on rehabilitation outcomes after recent severe brain injury: a randomized controlled evaluation. *Arch Phys Med Rehabil* 82: 174-182.
  26. Ivey FM, Ryan AS, Hafer-Macko CE, Goldberg AP, Macko RF (2007) Treadmill aerobic training improves glucose tolerance and indices of insulin sensitivity in disabled stroke survivors: a preliminary report. *Stroke* 38: 2752-2758.
  27. Enzinger C, Dawes H, Johansen-Berg H, Wade D, Bogdanovic M, et al. (2009) Brain activity changes associated with treadmill training after stroke. *Stroke* 40: 2460-2467.
  28. Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y (2011) The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol (Oxf)* 201: 275-287.
  29. Schmidt A, Wellmann J, Schilling M, Strecker JK, Sommer C, et al. (2014) Meta-analysis of the efficacy of different training strategies in animal models of ischemic stroke. *Stroke* 45: 239-247.
  30. Wang RY, Yu SM, Yang YR (2005) Treadmill training effects in different age groups following middle cerebral artery occlusion in rats. *Gerontology* 51: 161-165.
  31. Zhang P, Zhang Y, Zhang J, Wu Y, Jia J, et al. (2013) Early Exercise Protects against Cerebral Ischemic Injury through Inhibiting Neuron Apoptosis in Cortex in Rats. *Int J Mol Sci* 14: 6074-6089.
  32. Mizutani K, Sonoda S, Hayashi N, Takasaki A, Beppu H, et al. (2010) Analysis of protein expression profile in the cerebellum of cerebral infarction rats after treadmill training. *Am J Phys Med Rehabil* 89: 107-114.
  33. Zhang P, Yu H, Zhou N, Zhang J, Wu Y, et al. (2013) Early exercise improves cerebral blood flow through increased angiogenesis in experimental stroke rat model. *J Neuroeng Rehabil* 10: 43.
  34. Tian S, Zhang Y, Tian S, Yang X, Yu K, et al. (2013) Early exercise training improves ischemic outcome in rats by cerebral hemodynamics. *Brain Res* 1533: 114-121.
  35. Choe MA, An GJ, Lee YK, Im JH, Choi-Kwon S, et al. (2006) Effect of early low-intensity exercise on rat hind-limb muscles following acute ischemic stroke. *Biol Res Nurs* 7: 163-174.
  36. Kim G, Kim E (2013) Effects of treadmill training on limb motor function and acetylcholinesterase activity in rats with stroke. *J Phys Ther Sci* 25: 1227-1230.
  37. Li L, Rong W, Ke Z, Hu X, Yip SP, et al. (2011) Muscle activation changes during body weight support treadmill training after focal cortical ischemia: A rat hindlimb model. *J Electromyogr Kinesiol* 21: 318-326.
  38. Page SJ, Gater DR, Bach-Y-Rita P (2004) Reconsidering the motor recovery plateau in stroke rehabilitation. *Arch Phys Med Rehabil* 85: 1377-1381.
  39. Newman M (1972) The process of recovery after hemiplegia. *Stroke* 3: 702-710.
  40. Parker VM, Wade DT, Langton Hower R (1986) Loss of arm function after stroke: measurement, frequency, and recovery. *Int Rehabil Med* 8: 69-73.
  41. Dean CM, Shepherd RB (1997) Task-related training improves performance of seated reaching tasks after stroke. A randomized controlled trial. *Stroke* 28: 722-728.
  42. Buchheit M, Laursen PB (2013) High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle. Part II: anaerobic energy, neuromuscular load and practical applications. *Sports Med* 43: 927-954.
  43. Buchheit M, Laursen PB (2013) High-intensity interval training, solutions to the programming puzzle: Part I: cardiopulmonary emphasis. *Sports Med* 43: 313-338.
  44. Bartlett JD, Close GL, MacLaren DP, Gregson W, Drust B, et al. (2011) High-intensity interval running is perceived to be more enjoyable than moderate-intensity continuous exercise: implications for exercise adherence. *J Sports Sci* 29: 547-553.
  45. Burgomaster KA, Howarth KR, Phillips SM, Rakobowchuk M, Macdonald MJ, et al. (2008) Similar metabolic adaptations during exercise after low volume sprint interval and traditional endurance training in humans. *J Physiol* 586: 151-160.
  46. Burgomaster KA, Hughes SC, Heigenhauser GJ, Bradwell SN, Gibala MJ (2005) Six sessions of sprint interval training increases muscle oxidative potential and cycle endurance capacity in humans. *J Appl Physiol* (1985) 98: 1985-1990.
  47. Gibala MJ, Little JP, van Essen M, Wilkin GP, Burgomaster KA, et al. (2006) Short-term sprint interval versus traditional endurance training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J Physiol* 575: 901-911.
  48. Gibala MJ, McGee SL (2008) Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? *Exerc Sport Sci Rev* 36: 58-63.
  49. Rakobowchuk M, Tanguay S, Burgomaster KA, Howarth KR, Gibala MJ, et al. (2008) Sprint interval and traditional endurance training induce similar improvements in peripheral arterial stiffness and flow-mediated dilation in healthy humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R236-242.
  50. Wisløff U, Ellingsen Ø, Kemi OJ (2009) High-intensity interval training to maximize cardiac benefits of exercise training? *Exerc Sport Sci Rev* 37: 139-146.
  51. Moholdt T, Madssen E, Rognmo O, Aamot IL (2013) The higher the better? Interval training intensity in coronary heart disease. *J Sci Med Sport* .
  52. Moholdt TT, Amundsen BH, Rustad LA, Wahba A, Lovo KT, et al. (2009) Aerobic interval training versus continuous moderate exercise after coronary artery bypass surgery: a randomized study of cardiovascular effects and quality of life. *Am Heart J* 158: 1031-1037.

53. Weston KS, Wisløff U, Coombes JS (2013) High-intensity interval training in patients with lifestyle-induced cardiometabolic disease: a systematic review and meta-analysis. *Br J Sports Med* .
54. Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognmo Ø, et al. (2007) Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation* 115: 3086-3094.
55. Guiraud T, Nigam A, Gremeaux V, Meyer P, Juneau M, et al. (2012) High-intensity interval training in cardiac rehabilitation. *Sports Med* 42: 587-605.
56. Warburton DE, McKenzie DC, Haykowsky MJ, Taylor A, Shoemaker P, et al. (2005) Effectiveness of high-intensity interval training for the rehabilitation of patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 95: 1080-1084.
57. Duncan P, Studenski S, Richards L, Gollub S, Lai SM, et al. (2003) Randomized clinical trial of therapeutic exercise in subacute stroke. *Stroke* 34: 2173-2180.
58. Meyer P, Gayda M, Juneau M, Nigam A (2013) High-intensity aerobic interval exercise in chronic heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 10: 130-138.
59. Gjellesvik TI, Brurok B, Hoff J, Tørhaug T, Helgerud J (2012) Effect of high aerobic intensity interval treadmill walking in people with chronic stroke: a pilot study with one year follow-up. *Top Stroke Rehabil* 19: 353-360.
60. Askim T, Dahl AE, Aamot IL, Hokstad A, Helbostad J, et al. (2013) High-Intensity Aerobic Interval Training for Patients 3-9 Months After Stroke. A Feasibility Study. *Physiother Res Int* .
61. Cifu DX, Stewart DG (1999) Factors affecting functional outcome after stroke: a critical review of rehabilitation interventions. *Arch Phys Med Rehabil* 80: S35-39.
62. da Cunha IT Jr, Lim PA, Qureshy H, Henson H, Monga T, et al. (2002) Gait outcomes after acute stroke rehabilitation with supported treadmill ambulation training: a randomized controlled pilot study. *Arch Phys Med Rehabil* 83: 1258-1265.
63. Maulden SA, Gassaway J, Horn SD, Smout RJ, DeJong G (2005) Timing of initiation of rehabilitation after stroke. *Arch Phys Med Rehabil* 86: S34-34S40.
64. Paolucci S, Antonucci G, Grasso MG, Morelli D, Troisi E, et al. (2000) Early versus delayed inpatient stroke rehabilitation: a matched comparison conducted in Italy. *Arch Phys Med Rehabil* 81: 695-700.
65. Musicco M, Emberti L, Nappi G, Caltagirone C; Italian Multicenter Study on Outcomes of Rehabilitation of Neurological Patients (2003) Early and long-term outcome of rehabilitation in stroke patients: the role of patient characteristics, time of initiation, and duration of interventions. *Arch Phys Med Rehabil* 84: 551-558.
66. Yang YR, Wang RY, Wang PS (2003) Early and late treadmill training after focal brain ischemia in rats. *Neurosci Lett* 339: 91-94.
67. Ward NS (2005) Mechanisms underlying recovery of motor function after stroke. *Postgrad Med J* 81: 510-514.

## **High- versus moderate-intensity training on neuroplasticity and functional parameters after focal ischemia**

Caroline PIN-BARRE, MS<sup>1</sup>; Annabelle CONSTANS, MS<sup>2</sup>; Patrick DECHERCHI, PhD<sup>2</sup>; Jeanick BRISSWALTER, PhD<sup>1</sup>; Christophe PELLEGRINO, PhD<sup>2,3</sup>; Jérôme LAURIN, PhD<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Univ Nice Sophia Antipolis, Université de Toulon, LAMHESS, Nice, France

<sup>2</sup> Aix Marseille Univ, CNRS, ISM, Marseille, France

<sup>3</sup> Aix Marseille Univ, INSERM, INMED, Marseille, France

### **Corresponding author:**

Dr. Jérôme LAURIN

UMR CNRS 7287 « Institut des Sciences du Mouvement : Etienne-Jules MAREY »

163, avenue de Luminy – CP 910

13288 Marseille cedex 09 - France

E-mail: jerome.laurin@univ-amu.fr

Tel.: +33 (0)4-91-82-84-11

**Cover title:** Effectiveness of endurance programs after stroke

### **List of table and figures:**

**Table 1:** Training features

**Figure 1:** Grip force, EBST and climbing test

**Figure 2:** Resting lactatemia,  $S_{LT}$  and  $S_{max}$

**Figure 3:** Iba-1 positive cells

**Figure 4:** p75<sup>NTR</sup>

**Figure 5:** NKCC1/KCC2

**Key words:** Key words: Interval training; Grip force; Lactate threshold; p75; microglia; KCC2.

**Number of words:** XXXX words



# Abstract

**Background and Purpose-**This study was designed to compare the effects of high-intensity interval training (HIT) and moderate-intensity continuous training (MOD) on functional, metabolic and cerebral plasticity during the first 14 days following cerebral ischemia.

**Methods-**Rats were randomized as follows: Control (n=15), SHAM (n=9), MCAO (middle cerebral artery occlusion- reperfusion without rehabilitation, n=13), MCAO-D1 (sacrificed at day 1 after MCAO, n=6), MOD (n=13, MOD program) and HIT (n=13, HIT program). An incremental test was performed at day 1 (D1) and 14 (D14) post-surgery to identify the running speed associated with the lactate threshold ( $S_{LT}$ ) and the maximal speed ( $S_{max}$ ). The elevated body swing test, the ladder-climbing test and the forelimb grip force were performed at D1, D7 and D14. Immunostaining and western blot analysis were performed for Iba-1, p75<sup>NTR</sup>, KCC2 and NKCC1 proteins at D15.

**Results-** $S_{LT}$  and  $S_{max}$  decreased from D1 for injured groups. HIT program was more effective to improve both  $S_{LT}$  and  $S_{max}$  (from D1 to D14: +68.8±16.7% and 54.0±17.7%) compared to MOD program (+23.6±31.1% and +31.4±17.7%), but also induced a fast and complete recovery of the impaired forelimb grip force. After training, immunostaining analysis revealed that Iba-1 positive cells of amoeboid form were lower in HIT group (20.6%±5.2; 11.3%±3.1) compared to MOD (74.9%±29; 54.3%±22.2) and MCAO (77.1%±31.5; 46.9 %±29.9) groups in ipsi- and contralesional hemispheres respectively hemispheres. This was associated with p75<sup>NTR</sup> overexpression in ipsilesional side and restoration of NKCC1/KCC2 ratio in contralesional side.

**Conclusions-**Based on lactate threshold, HIT program appears to be more effective than MOD program to improve aerobic fitness, functional recovery of grip strength and cerebral plasticity after cerebral ischemia despite lower exercise duration.

## Introduction

Ischemic stroke remains the leading cause of severe long-term physical disorders. Poststroke hemiparesis frequently leads to physical deconditioning that strongly reduces the quality of life and represents an important burden on the family and society. There is growing evidence from animal and human experiments showing that aerobic training promote beneficial effects at the cardiovascular, muscular, cerebral and functional levels<sup>1,2</sup>. Indeed, moderate-intensity aerobic training (MOD; exercise intensity 40-70% of the maximum heart rate reserve; 20-60 min/session according to the current recommendations) is to date advised to increase the peak oxygen uptake ( $VO_{2peak}$ ) and/or maximal running speed ( $S_{max}$ ) but also the lactate or ventilatory threshold<sup>2-7</sup>. These physiological determinants of endurance performance are considered to be strong indicators of the quality of life<sup>8-11</sup>.

Moreover, early treadmill training could promote cerebral plasticity in parallel with functional recovery after cerebral ischemia by acting, among other mechanisms, on brain inflammatory processes, neurotrophic factor levels and synaptic plasticity<sup>12-15</sup>. One important mechanism conditioning the neuroplasticity is related to stroke-induced microglia activation. Indeed, microglia activation, which is the resident macrophages of the brain, mainly contributes to the lesion severity by increasing the level of pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species (M1 phenotype)<sup>16</sup>. However, early running training could change the microglia phenotype (M1 to M2) by decreasing the release of pro-inflammatory cytokines and increasing both anti-inflammatory cytokines and neurotrophic factor levels, which is related to neuroprotection<sup>17-19</sup>. Furthermore, MOD is well known to up-regulate the endogenous expression of BDNF and its receptor TrkB in both hemispheres<sup>7</sup>. Nevertheless, the neurotrophin action also depends on the pan-neurotrophin receptor p75 ( $p75^{NTR}$ ) expression that can be either beneficial when its affinity with the Trk receptors increases, or deleterious, when its affinity with the non-neurotrophin receptors (Sortilin, Nogo-A for example)

increases <sup>20</sup>. However, only one recent study in older rats indicated that aerobic training could increase the expression of p75<sup>NTR</sup> suggesting adaptive neuroplasticity <sup>21</sup>. The p75<sup>NTR</sup> expression could act on synaptic plasticity, as indicated by its action on the K-Cl co-transporter (KCC2, a chloride extruder) and Na-K-Cl co-transporter (NKCC1) after central nervous system (CNS) trauma <sup>22,23</sup>. Cerebral ischemia induced an increase in NKCC1 expression and a decrease of KCC2 expression resulting in a change in the balance of excitation and inhibition in CNS by altering response of the neurotransmitter GABA from excitatory to inhibitory <sup>24,25</sup>. Aerobic training is known to change KCC2 and NKCC1 expression after spinal cord injury allowing to functional recovery <sup>26</sup> but no findings were found on the effect of aerobic training on KCC2 and NKCC1 expression after cerebral ischemia.

In addition, beneficial effects of MOD on functional recovery remain frequently controversial suggesting that exercises recommendations need improvements <sup>2,3,27</sup>. It is noteworthy to add that it is crucial to define a safe and effective dosage of training by modulating the exercise parameters (i.e, intensity, volume and frequency of exercise) similarly to pharmacological drug administration, in which it is unthinkable to administrate it without determining the appropriate dosage. It has been recently shown that higher training intensities induced encouraging gains in peak oxygen uptake (VO<sub>2peak</sub>) and might also be effective for locomotor abilities recovery <sup>28-30</sup>. Given that exercise intensity is a key variable to improve cardiorespiratory fitness, the guidelines for exercise intensities need to be reconsidered for stroke patients.

High-intensity interval training (HIT), allowing to reach highest relative aerobic intensities, is feasible and safe in individuals with moderate stroke <sup>31,32</sup>. This type of intense exercise could improve VO<sub>2peak</sub>, running economy and functional recovery, without increasing complications <sup>30,31</sup>. However, these effects remain controversial and no clear

evidence indicates whether the beneficial outcomes of HIT on the physiological determinants of performance and neuroplasticity are superior or not compared to MOD<sup>30,31,33</sup>. Given that HIT is a time-efficient strategy promoting rapid physiological adaptations and cerebral plasticity<sup>34,35</sup>, we suggested that it might accentuate functional recovery and neuroplasticity in the acute phase of cerebral ischemia compared to MOD.

In light of these considerations, the present study was designed to compare the effects of HIT and MOD programs on functional outcomes and cerebral plasticity during the first 14 days following cerebral ischemia in rats. It seems important to add that the ability to prescribe the optimal training stimulus might be greater whether training intensity are based on a physiological parameter other than peak heart rate or maximal running speed or on empirical evidence (non-individualized training) because these training protocols are not relevant to distinguish high from moderate running speeds, even in animal studies<sup>8,14,36-38</sup>. Therefore, one of the key point of the proposed endurance protocols relies on determining for each animal the specific training intensity from the submaximal physiological indicator i.e. the running speed associated with the lactate threshold ( $S_{LT}$ )<sup>8</sup>. Although the  $S_{LT}$  is underestimated in stroke rehabilitation, it could clearly dissociate the high from the moderate-training intensities (lactate accumulation or not) and it is also highly sensitive to assess aerobic fitness<sup>8,38-40</sup>.

## Material and methods

### *Animals*

Overall, 108 adult male Sprague-Dawley rats (weighting 250-270 g; Centre d'élevage Roger JANVIER, Le Genest Saint Isle, France) were used but 72 of them were included (maintained at 22°C with a 12 h light/dark cycle). Food and water were available *ad libitum*. The rat weight was controlled daily. Animals were excluded when one of the following point was observed: 1) the weight exceeded 270 g before MCAO surgery, 2) the temperature was over 38°C during the surgery, 3) animals were not able to run on treadmill either during the familiarization period or after the surgery at D1, 4) animals were prostrate or had lost more 20% of their baseline weight and 5) animals did not exhibit sensorimotor deficits at D1 from behavioral tests (see below). Anaesthesia and surgical procedures were performed according to the French law on animal care guidelines. Animal Care Committees of *Aix-Marseille Université* (AMU) and *Centre National de la Recherche Scientifique* (CNRS) approved our protocol.

Animals were randomly divided into 6 experimental groups: 1) Control (n=15) in which no surgery was performed that enabled us to verify the reliability of behavioral and metabolic measurements on 14 days. Three Control animals were used to assess the influence of repetitive blood lactate samples at the tail level on maximal performance during incremental exercise test <sup>41</sup>; 2) SHAM (n=9) in which animals underwent surgery without cerebral ischemia that enabled us to ensure that surgery did not affect the overall measurements; 3) MCAO (n=13) in which animals underwent middle cerebral artery occlusion-reperfusion (MCAO-r) surgery but without endurance program; 4) HIT (n=13); 5) MOD (n=13) in which animals underwent MCAO-r surgery and carried out HIT and MOD programs respectively and 6) MCAO-D1 (n=6) in which animals underwent MCAO-r surgery

and were sacrificed at D1 to confirm that the infarct volume was reproducible between animals.

### ***MCAO-r surgery***

Central temperature (maintained at 37-38°C with homeothermic blanket; Homothermic Blanket Control Unit, K01345CE, Holliston, MA, USA), age, weight, sex and ischemia duration were rigorously controlled, in order to ensure a reproducible lesion size between animals. The surgery procedure was described elsewhere<sup>42</sup>. Briefly, anaesthesia was induced and maintained with 5% and 2.5-3% of isoflurane respectively (Anesteo, Villetelle, France). The external, internal and common carotid arteries (ECA, ICA and CCA) were exposed. After a partial arteriotomy on ECA, a 0-4 monofilament nylon suture (silicon-coated tip length and diameter: 5 mm and 0.39±0.02 mm respectively) was inserted into the ICA via the ECA and approximately pushed 20 mm away from the carotid bifurcation. Blood flow was thus blocked at the middle cerebral artery origin for 120 min. Then, the monofilament was removed to allow reperfusion. Finally, the skin was sutured. We can add that the experimenters, performing functional, metabolic and immunohistological assessments were blind to the assignment of animals to specific groups.

### ***Behavioral tests***

Animals were familiarized 4 times with the 3 behavioral tests during the first week before the experiment. Behavioral tests were performed, as previously described<sup>42</sup> before (PRE) and after the surgery at day 1, 7 and 14 (D1, D7 and D14 respectively) to assess functional outcomes following MCAO-r.

***Elevated body swing test (EBST)***. Animals were suspended by the base of the tail. A swing was recorded each time the animal raised to either its left or right side (more than 10 degrees). Ten swings were recorded. The number of swings made to the left side was divided by the total number of swings (left swings/total swings ratio).

**Ladder-climbing test.** Rats climbed up an inclined ladder (Inclination: 45° angle; rungs of equal 10 mm spacing). The left paw grip was recorded with a numerical camcorder (MV 830i; Canon, Courbevoie, France; 100-Hz) and analyzed with SimiMotion software (Unterschleissheim, Germany). If the grip on the rung was correct, the score was 2 points. If the rung was completely missed by the left forepaw, the score was 0 point. If the paw slipped on the rung, incompletely gripped it, or touched intermediate rungs during the swing phase, the score was 1 point. For each testing session, the successful score was normalized by the maximal score, depending on the number of performed steps (20 steps minimum).

**Forelimb grip force.** The grip forces exerted by both forepaws and by each forepaw separately were quantified by using a grip force tester (Grip Strength Tester bio-GT3, Bioseb, Vitrolles, France). The rat was held by the base of its tail and by its body above the bar. When its forelimbs, or each forepaw separately, grasped the middle of the bar, the experimenter pulled the rat following the axis of the sensor (horizontally) until the grasp was released. The left forelimb force was then normalized by the right forelimb force to calculate the Left/Right ratio (L/R). The time interval between each trial was fixed to 1 min to avoid fatigue accumulation. The 2 maximal forces (in grams) were averaged for each session (in each condition) and expressed in percentage of PRE values.

#### ***Incremental exercise test: $S_{LT}$ and $S_{max}$ determination***

All rats were familiarized before the experiment with treadmill running (5 min per day, 3 days per week during 2 weeks). Then, incremental exercise tests were performed on 1° inclined treadmill at D1 and D14. Those tests started with 5 min of warm-up at 9m/min to reduce stress and increase aerobic metabolic rate. Then, running speed was increased by 3m/min every 3 min until animals could not maintain the imposed speed despite slight electrical and/or sound stimulations<sup>43,44</sup>.  $S_{max}$  was thus associated with the last reached stage.

Each stage was separated by 20s interval to perform blood sampling <sup>43</sup>. Blood lactate samples (0.2µl) were collected after partially cutting the distal area of the caudal vein of the tail. Blood lactate concentration (mmol/L) was thus measured with a portable device (Lactate Scout+, EKF diagnostics, Magdeburg, France), reliable for animal models <sup>45</sup>. Lactate threshold is detected at the previous stage when 1) the inflection point of blood lactate concentration was observed <sup>45-47</sup> and/or 2) an increase of 1 mmol/L between two blood lactate values was measured <sup>43</sup>. The  $S_{LT}$  was then determined.

The last blood sampling was performed during recovery (2 min after the last stage).

### ***HIT and MOD endurance programs on treadmill***

Treadmill training is considered as the most effective method to improve functional recovery after cerebral ischemia <sup>4</sup>. In accordance with stroke rehabilitation recommendations, 1) training started early after ischemia, 2) workload was progressively increased throughout the protocol and 3) running intensity was individualized <sup>3,4</sup>.

Precisely, HIT and MOD endurance programs included 10 sessions from D2 to D12 and two recovery days, D7 and D13 (in order to reduce fatigue accumulation that may affect the incremental test performance). For both programs, each session began by 5 min of warm-up at 70% of the  $S_{LT}$ .

***HIT program.*** Exercise was composed of 4x4min treadmill running interrupted by 3 min of active recovery between each series (4x3min). From the 1<sup>st</sup> to 5<sup>th</sup> sessions (week-1), running speed was fixed at 80% of the difference between  $S_{max}$  and  $S_{LT}$  in order to ensure that running speed was above the  $S_{LT}$  without exceeding the  $S_{max}$ . Then, running speed was increased to 95% of the same variation ( $S_{max} - S_{LT}$ ) from the 6<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> sessions (week-2). Running speed recovery was fixed at the  $S_{LT}$  throughout training.

***MOD program.*** Running speed was fixed at 80% of the  $S_{LT}$  to avoid lactate accumulation. The session duration depended of HIT workload (exercise + recovery) to match



the total amount energy expenditure between groups with the following calculation <sup>48</sup> : Mass (kg) x Intensity (m/min) x Duration (min) x Treadmill inclination (°) x 9.8 (J/kg.m).

The total workload was the same between groups (isocaloric sessions) because the energy expenditure needs to be equivalent between exercise types in order to only compare the influence of intensity, as indicated by previous studies <sup>49,50</sup>. Therefore, experimenters trained individually each rat (one at a time).

### ***Immunohistochemistry analysis***

***Immunostaining.*** At D15, animals (n=6 per group) were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine-xylazine solution (100 mg/kg – 10 mg/kg respectively). Then, animals were perfused transcardially (25 ml/min) with 250-300 ml of cold phosphate buffer saline (PBS X-1, pH: 7.4), followed by the same volume of antigenfix. Brain tissue was removed, post-fixed for 2h at 4°C in antigenfix, cryoprotected 24 h at 4°C in 30% sucrose and then snap-frozen with isopentane and stored at -80°C. Coronal sections of rat brain (slide thickness: 100 µm; Bregma +5.64mm to -6.84mm <sup>51</sup>) were performed before mounting onto Superfrost Plus glass slides. Sections were then permeabilized and blocked in PBS X-1 with 0.3% Triton X-100 and 5% normal goat serum (NGS) for 1 h at room temperature and incubated with primary antibodies diluted in PBS with 5% NGS and 0.1% Triton X-100 at 4°C overnight using rabbit anti-Iba-1 antibody (1:500, Life Science) or mouse anti-p75<sup>NTR</sup> (1:1000, Santa Cruz). After rinsing three times in PBS, slices were incubated with the corresponding secondary antibody diluted in PBS (1:500, Alexa Fluor 488 or 543, Molecular probes) for 1 h at room temperature and finally counterstained for 5 min with Hoechst 33258 (10 µg/ml in PBS, Sigma-Aldrich). Then coverslips were applied onto Superfrost Plus glass slides with Fluoromount G mounting medium. For quantitative analysis images were acquired with an Olympus Fluorview-500 confocal microscope (40×; 1.0 NA). We choose fields at the

peri-lesional site both from ipsi- and contra-hemispheres. Images were then acquired consecutively for Iba-1 and Hoechst staining. 25µm stack were acquired at 2.5µm step images. The Iba-1 positive cells (Iba-1+) morphology was manually assessed using the ImageJ software after making the images projection. Amoeboid Iba-1+ cells were expressed in percentage of total Iba-1+ cells. Acquisition parameters were the same for all experimental conditions. All acquisitions and analysis were done blind.

***Cresyl violet staining.*** One out of every four slides is stained (6 on 26 slides per brain) to have a representative cerebral injury. Sections were rinsed in distilled water for 5 min, incubated 3 min in a cresyl violet bath and then dehydrated through a sequence of ethanol baths (70, 95, and 100%). They were finally cleaned in Xylene during 2 min and medium mounted with coverslip using Permount (Fair Lawn,NJ, USA). For each section, the infarction size and the total size of each hemisphere were calculated with ImageJ software and expressed in percentage of the right hemisphere (RH).

#### ***Western blot analysis***

At D15, animals (n=4 per groups) were killed by decapitation after ketamine/xylazine solution (100 mg/kg - 10 mg/kg respectively) anesthesia. Hemispheres were quickly dissected out and separated, flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until processed. Brain tissue was homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; SDS 0.1%; Deoxycholic Acid 0.5%; 1% triton X-100), containing complete Protease/Phosphatase Inhibitor Tablet (Thermofisher) and loaded with Laemmli X-3 loading buffer. The sample proteins were separated in SDS-PAGE gel (4% stacking gel and 15% resolving; Criterion gel, Bio-Rad) by electrophoresis under constant voltage (75 V in stacking gel and 100 V in revolving gel). The proteins on gel were then transferred to nitrocellulose membrane (Whatman). The membranes were washed with Tris-buffered saline X-1 with 0.1% of Tween

(TBST) and blocked in TBST with 5% of bovine serum albumin (BSA). Membranes were exposed overnight at 4°C with the appropriate primary antibody diluted in blocking solution (TBST/2.5% BSA): mouse anti-p75<sup>NTR</sup> (1:1000, Santa Cruz), rabbit anti-KCC2 (1:5000, home product <sup>52</sup> and mouse anti-NKCC1 (1:2000, T4 antibody, DSHB, University of Iowa, USA). Then membranes were washed twice with TBST and secondary antibodies (1:1000, Alexa Fluor 543 anti-rabbit and Alexa Fluor 488 anti-mouse, Molecular probes) were applied 2 h at room temperature before fluorescent detection. We measured signal intensities with the image analysis software G box (Syngene). After rinsing three times in TBST and membranes were incubated with the corresponding primary antibody for normalization with rabbit anti- $\beta$ 3-tubulin (1:10000, Covance) or anti-Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:500, Millipore). The membranes were exposed to secondary antibodies (see above) before signal detection. Quantification was performed using Gel Plot Analyser plugin (Fiji). The relative expression levels are normalized to sham condition.

### ***Statistical analysis***

Statistical analysis was performed using SigmaStat<sup>®</sup> software program (San Jose, CA, USA). All data are presented as Mean $\pm$ SD. Behavioral test results and incremental exercises parameters were compared by two-way repeated measures ANOVA tests (groups x time). Immunostaining and western blotting analysis as well as lesion size results were compared by one-way analysis of variance (groups). Post-hoc comparisons were performed with Student-Newman-Keuls multiple post-test comparisons. Results were considered statistically significant, when  $p < 0.05$  (1, 2 or 3 symbols =  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$  respectively).

## Results

For the overall parameters, no difference was observed between Control and SHAM groups from PRE to D14. PRE values were also not different between the 5 groups.

### *Endurance program features*

Running speed of MOD group was lower than HIT group during the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> training weeks (-28.9% and -31.2% respectively). Session duration of MOD group was higher than HIT group during the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> weeks (+49.2%; +59.8% respectively) to match energy expenditure between groups (**Table 1**).

### *Behavioral tests*

We provide evidence that HIT program induced a complete and rapid grip force recovery than MOD program after cerebral ischemia. Nevertheless, both programs appeared to poorly impact the asymmetrical motor behavior and the movement precision of impaired forepaw.

#### *Forelimb grip force test*

***Grip force exerted by both forepaws and by the right forepaw alone.*** No difference was observed both within and between groups from PRE to D14 (*data not shown*).

***Grip force exerted by the left forepaw.*** Grip force decreased significantly between PRE and D1 for all injured-groups ( $p < 0.001$ ) and was significantly lower in MCAO, HIT and MOD groups than in Control ( $p < 0.001$ ) and SHAM ( $p < 0.001$ ) groups. Grip force remained significantly decreased ( $p < 0.01$ ) at D7 and D14 for both MCAO and MOD groups while it completely recovered in HIT group at D7 and D14 compared to PRE and grip force was significantly higher at D14 compared to D1 ( $p < 0.001$ ). Moreover, no difference was observed between Control, SHAM and HIT groups from D7 to D14 contrary to MCAO ( $p < 0.05$ ) and MOD ( $p < 0.001$ ) groups (**Figure 1.A**).

**L/R.** This ratio significantly decreased at D1 compared to PRE for MCAO, HIT and MOD groups ( $p<0.001$ ) and was lower within all injured-groups than Control and SHAM groups ( $p<0.001$ ). L/R ratio completely recovered only for HIT group from D7 to D14 compared to PRE ( $p<0.001$ ). Likewise, L/R ratio of HIT group was significantly higher than MCAO and MOD groups from D7 to D14 ( $p<0.01$ ) and remained similar to Control and SHAM groups, contrary to MCAO and MOD groups ( $p<0.01$ ) (**Figure 1.B**).

#### *Elevated body swing test (EBST)*

The left swings/total swings ratio significantly increased for MCAO, HIT and MOD groups at D1, D7 and D14 compared to PRE ( $p<0.001$ ).

Moreover, this ratio was significantly higher in MCAO, HIT and MOD groups compared to Control and SHAM groups from D1 to D14 ( $p<0.001$ ). There was no difference between HIT, MOD and MCAO groups (**Figure 1.C**).

#### *Ladder-climbing test*

Successful score significantly decreased for MCAO, HIT and MOD groups at D1, D7 and D14 compared to PRE ( $p<0.001$ ). Nevertheless, this score was significantly higher for MCAO, HIT and MOD groups at D1 compared to D7 ( $p<0.001$ ) and to D14 ( $p<0.001$ ;  $p<0.01$  and  $p<0.001$  respectively). Our results also showed that the scores of MCAO, HIT and MOD were significantly higher from D1 to D14 compared to Control and SHAM ( $p<0.001$  for all). There was no significant difference between HIT, MOD and MCAO groups (**Figure 1.D**).

#### *Incremental exercise test*

Our results indicated that HIT program was more effective for improving aerobic fitness than MOD program as indicated by changes in  $S_{max}$  and  $S_{LT}$ .

### *Resting blood lactate concentration*

The resting blood lactate of MCAO group was significantly higher at D14 ( $4.4 \pm 1.4$  mmol/L) compared to D1 ( $2.4 \pm 0.8$  mmol/L;  $p < 0.001$ ) while no difference was observed for the other groups. Moreover, the resting blood lactate concentration of MCAO groups at D14 was significantly higher ( $p < 0.001$  for all) compared to Control ( $2.2 \pm 0.6$  mmol/L), SHAM ( $2.0 \pm 0.6$  mmol/L), MOD ( $3.1 \pm 1.3$  mmol/L) and HIT ( $2.7 \pm 1.1$  mmol/L) groups (**Figure 2.A**). No difference was observed at D14 between HIT group and uninjured animals.

### *S<sub>LT</sub>*

S<sub>LT</sub> of MCAO, HIT and MOD groups at D1 were significantly lower than the one in Control ( $p < 0.001$  for all) and SHAM ( $p < 0.001$  for all) groups (**Figure 2.B**). S<sub>LT</sub> significantly increased from D1 to D14 for HIT ( $20.4 \pm 2.4$  m/min for D1 and  $34.5 \pm 3.8$  m/min for D14;  $p < 0.001$ ) and MOD ( $21.8 \pm 3.3$  m/min for D1 and  $26.7 \pm 5.3$  m/min for D14;  $p < 0.01$ ) groups contrary to MCAO ( $22.5 \pm 3.9$  m/min for D1 and  $22.5 \pm 4.5$  m/min for D14), Control ( $32.8 \pm 3.9$  m/min for D1 and  $30.8 \pm 4.1$  m/min for D14) and SHAM ( $34.7 \pm 4.3$  m/min for D1 and  $33.7 \pm 3.6$  m/min for D14) groups (**Figure 2.C**). However, The S<sub>LT</sub> of HIT group at D14 was higher compared to MOD ( $p < 0.001$ ), MCAO ( $p < 0.001$ ) groups (no difference between HIT group and Control and SHAM groups). Otherwise, the S<sub>LT</sub> of MOD group was higher compared to S<sub>LT</sub> of MCAO group at D14 ( $p < 0.01$ ) but remained significantly lower than Control and SHAM groups ( $p < 0.01$ ). An example of lactatemia kinetic obtained during the incremental test performed before and after HIT program (**Figure 2.D**).

### *S<sub>max</sub>*

Our results indicated that the S<sub>max</sub> at D1 in MCAO, HIT and MOD groups was significantly lower compared to Control and SHAM groups ( $p < 0.001$  for all) (**Figure 2.B**). However, S<sub>max</sub> significantly increased from D1 to D14 for HIT ( $26.1 \pm 3.5$  m/min for D1 and  $40.8 \pm 5.9$  m/min for D14;  $p < 0.001$ ) and MOD ( $27.0 \pm 3.3$  m/min for D1 and  $35.7 \pm 4.5$  m/min

for D14;  $p < 0.001$ ) groups contrary to MCAO ( $27.5 \pm 4.9$  m/min for D1 and  $30.0 \pm 5.4$  m/min for D14), Control ( $40.0 \pm 4.5$  m/min for D1 and  $39.8 \pm 4.3$  m/min for D14) and SHAM ( $43.2 \pm 4.5$  m/min for D1 and  $41.3 \pm 2.9$  m/min for D14) groups (**Figure 2.C**). Moreover, the  $S_{LT}$  at D14 of HIT group was significantly higher compared to MOD ( $p < 0.05$ ) and MCAO ( $p < 0.001$ ) groups and no difference was observed with SHAM and Control groups. Otherwise, the  $S_{max}$  of MOD group was higher compared to  $S_{max}$  of MCAO group at D14 ( $p < 0.01$ ) but remained significantly lower than Control and SHAM groups ( $p < 0.05$ ).

Finally, there was no difference between the  $S_{max}$  of the 3 additional animals and Control and SHAM animals (*data not shown*). No difference was observed for blood lactate concentration during recovery (*data not shown*).

### ***Immunohistochemistry***

***Iba-1 staining.*** At D15, the number of amoeboid Iba-1+ cells was significantly lower in HIT group ( $20.6\% \pm 5.2$ ) than in MOD ( $74.9\% \pm 29$ ;  $p < 0.01$ ) and MCAO ( $77.1\% \pm 31.5$ ;  $p < 0.001$ ) groups at level of peri-lesional site from ipsilateral (right) hemisphere (**Figure 3.A and 3.B**). Likewise, at the same anatomic level within the contralateral (left) hemisphere, the number of amoeboid Iba-1+ cells was significantly lower in HIT group ( $11.3\% \pm 3.1$ ) than in MOD ( $54.3\% \pm 22.2$ ;  $p < 0.01$ ) and MCAO ( $46.9\% \pm 29.9$ ;  $p < 0.01$ ) groups (**Figure 3.C and 3.D**).

***Qualitative staining of p75<sup>NTR</sup>.*** The cells of damaged hemispheres express p75<sup>NTR</sup> proteins in all lesioned groups contrary to SHAM group (**Figure 4**). These results are confirmed by western blot analysis.

***Cresyl violet.*** The infarction sizes of the MCAO-D1, MCAO, HIT and MOD groups were  $25.0 \pm 3.0\%$ ,  $23.0 \pm 3.0\%$ ,  $21.0 \pm 6.0\%$  and  $22.0 \pm 6.0\%$  of the coronal slice total area respectively, but no significant difference was observed between them (*data not shown*).

### ***Western Blotting***

***p75<sup>NTR</sup> expression normalized to SHAM condition.*** The relative expression of p75<sup>NTR</sup> protein within the ipsilateral hemisphere in HIT (+ 336.5%; p<0.01) and MOD (+ 208.4%; p<0.05) groups is significantly higher than the one of SHAM contrary to MCAO groups (+ 183.8%). However, the relative expression of p75<sup>NTR</sup> is not different between lesioned groups (**Figure 4**). Furthermore, in the contralateral hemisphere, the relative expression of p75<sup>NTR</sup> is not different between SHAM, MCAO (- 5.4%), MOD (- 22.7%) and HIT (+ 40.9%) (**Figure 4**).

***NKCC1/KCC2 ratio.*** In the ipsilateral hemisphere, no difference was observed for NKCC1/KCC2 ratio between MCAO (2.20±1.46), MOD (4.23±5.16), HIT (1.75±0.89) and SHAM (1.05±0.68) (*data not shown*). The NKCC1/KCC2 ratio of HIT group (0.62±0.16) is significantly lower to the one of MCAO (1.16±1.36; p<0.05) and MOD (2.42±1.38; p<0.05) groups in the contralateral hemisphere. However, no difference was observed between lesioned groups and the SHAM group (**Figure 5**).

### **Discussion**

This study is the first to compare the effect of isocaloric HIT and MOD programs on neuroplasticity and functional outcomes after cerebral ischemia. We used the physiological determinants of endurance performance ( $S_{LT}$  and  $S_{max}$ ) to both improve the exercise intensity prescription and assess the effectiveness of aerobic programs on multidisciplinary aspects <sup>48</sup>. The use of lactate threshold enabled defining high (>25m/min) and moderate (<20m/min) running speed in an individualized manner for each animal with cerebral ischemia. Such intensity ranges were not in accordance to previous studies in which exercise intensity between 10-13m/min was considered as intense for MCAO rats <sup>36,38</sup>. The difference might be



explained by their use of empirical training intensities or maximal parameters ( $S_{\max}$  or  $VO_{2\text{peak}}$ )<sup>8,38-40</sup>. Thus, further studies might use such submaximal physiological parameter that seems suitable to better dissociate the high from the moderate-training intensities. Concerning the lactate measurement during the incremental test, it seems useful to add that the measure of blood lactate concentration 2 min after the treadmill test was not relevant to assess training effectiveness because of a too large variability between animals. Our additional results indicated that  $S_{\max}$  was not altered by regular venous blood sample that was not in agreement to another study, which suggested a performance change due to repeated lactate sample<sup>41</sup>. In addition, we used only males in this study as observed in several other studies<sup>7,14,36,37,53,54</sup>. Rats could begin an individualized intense endurance program at an early time point (D2) that seemed not to be deleterious for functional recovery, neuroplasticity and infarct volume<sup>41</sup>. It was in accordance to previous studies that showed that a treadmill training starting during the 5 first days induced beneficial effects on recovery while the animal limb function was less improved and larger cortical infarct volume was observed when training began before 24 h post-ischemia<sup>4,19,37,55</sup>. However, it seems necessary to add that the timing of aerobic program initiation should be obviously different for human (i.e., equivalent to 15-80 days approximately) and thus our result did not suggest that HIT need to be recommended during the first two weeks after stroke<sup>41,56</sup>. Nevertheless, HIT is feasible during subacute phase in individuals with moderate stroke and thus needs to be explored in further studies. Moreover, HIT induced rapid physiological adaptations although its session duration was clearly shorter compared to MOD (-49% to -60%, despite identical workload) that has already been observed for other diseases<sup>57</sup> confirming that HIT is well-known to be a time-efficient strategy<sup>35</sup>. Such finding is important given that 'lack of time' remains the most cited barrier by patient to regular aerobic exercise participation.

Our study revealed a maintained decrease of  $S_{LT}$  and  $S_{max}$  during the first 14 days after MCAO-r for non-trained animals. It is thus strongly argued that spontaneous aerobic fitness recovery is insufficient. Another study also observed  $S_{LT}$  alteration two days post-ischemia<sup>58</sup>. We supposed that the decreased  $S_{LT}$  at D1 might essentially be associated with sensorimotor alterations such as interlimb coordination or strength deficits that was also observed in this study. Indeed, several authors postulated that neuromuscular disorders might interact with metabolic deficits<sup>59</sup>. Nevertheless, the  $S_{LT}$  reduction at D14 might not be attributed to the fast muscular atrophy and the associated changes in muscular typology observed after cerebral ischemia from D7<sup>38</sup>. Given that the  $S_{LT}$  is influenced by muscular typology composition, it might partially explain the decrease of  $S_{LT}$  at D14.

Nevertheless, HIT was more effective than MOD to improve aerobic fitness as indicated by a superior increase of  $S_{LT}$  and  $S_{max}$ . It is in agreement with studies indicating that HIT induced higher effects on  $S_{LT}$  or ventilatory threshold 1 than MOD both in healthy or cardiovascular patients<sup>49,60</sup>. It might thus be suggested that the lactate transport mechanisms might be more effective during incremental exercise after HIT program, shifting the  $S_{LT}$  to higher intensities. It might also be possible that treadmill training increased the recruitment of low motor units limiting the early recruitment of glycolytic muscle fibers. HIT and MOD are also known to improve the maximal oxidative capacity in human and animal models by increasing  $VO_{2peak}$  and muscular blood flow<sup>6,41</sup>. These adaptive mechanisms might contribute to explain the  $S_{max}$  improvement. However, HIT are more effective than MOD to improve maximal running abilities ( $\approx 57\%$  vs.  $\approx 33\%$  respectively) as it was recently observed in individual with stroke and on rats with chronic heart failure<sup>29,49,61</sup>.

Our study also revealed a resting hyperlactatemia 14 days after the cerebral ischemia in non-trained rats. High lactate levels during the acute phase of stroke ( $< 3$  months;  $> 2$  mmol/L) was also observed on 25% of stroke patients and seemed to have deleterious

repercussions on functional recovery as well as on mortality rate <sup>62</sup>. In addition, given that HIT and MOD programs are well known to increase the lactate transporter expression (MCT1 and MCT4) <sup>63</sup>, the lactate clearance might be improved by MOD and HIT preventing thus hyperlactatemia.

In accordance with a previous study, we also found that the decrease of left forepaw grip force and its consequent strength asymmetry persisted until D14 without showing significant spontaneous recovery <sup>42</sup>. It could be partially explained by an alteration of  $\alpha$ -motoneuron recruitment and muscle atrophy (except for D1) but also by mechanical sensitive deficits, avoiding animals to correctly grip the force bar. Moreover, HIT program induced a complete and rapid recovery of the left forepaw grip force from D7 contrary to the MOD program. The force improvement might be explained by a facilitation of fast motor units recruitment contrary to MOD program. Indeed, HIT running speed, fixed beyond the lactate threshold, is known to facilitate the glycolytic muscle cell activation <sup>32</sup>. Nevertheless, both programs appeared to poorly impact asymmetrical motor behavior and movement precision of impaired forepaw, similar to what it was already observed after treadmill training <sup>64</sup>. Therefore, such endurance programs might be associated with specific oriented-tasks to maximize functional recovery.

From Iba-1 staining, our results indicate that microglial cells remain reactive within both hemispheres in lesioned animals whether or not trained, reflecting an inflammatory state. However, in this condition, it is not possible to distinguish resting microglia and circulating macrophage/monocyte cells with Iba-1 staining. Moreover, our study shows an inflammatory activity at contralesional side level which is not always observed <sup>65</sup>. This might be related to lesion severity that is different in our study (120 min against 90 min in Ito *et al*) <sup>65</sup>.

Microglial morphology differs between groups of trained and non-trained animals. Amoeboid form (round) is considerable in MCAO and MOD animals (88% and 75% of Iba-1

positive cells within injured hemisphere as well as 43% and 50% within contralateral hemisphere respectively). This microglial form acts as phagocytes and secretes pro-inflammatory agents and free radicals, considered as detrimental (M1 phenotype) <sup>66</sup>. It seems in our study that exercise intensity might not be sufficient in MOD group to promote significant changes in microglia morphology. In other words, work intensity under the LT appeared not to be the most effective strategy to reduce deleterious effects of inflammation at cerebral level after brain ischemia. However, microglial cells in HIT group at D15 mainly showed ramified reactive form within both hemispheres (amoeboid form 20% and 11% in ipsilateral and contralateral side respectively). This is in accordance with previous studies showing that physical training could induce microglia morphological changes and thus its function <sup>67</sup>. Nevertheless, ramified form could exert opposite functions, either having detrimental pro-inflammatory activity (M1 phenotype), or beneficial anti-inflammatory activity (M2 phenotype) by secreting anti-inflammatory cytokines and neurotrophins. As the aim of the present study was to investigate whether training intensity could have an influence on microglial morphology, pro- and anti-inflammatory cytokines, features of M1 or M2 phenotypes were not be quantified but need to be investigated to bring direct evidence of microglial function after training. However, several arguments allow us to suggest that M2 phenotype could predominate within HIT animals. It was demonstrated that aerobic training might induce a shift from M1 to M2 phenotype in animals with neurodegenerative diseases <sup>59,60</sup>. These results are confirmed by a study within healthy mice showing that vigorous training on treadmill (26 m/min, 60 min, 10% slope) enhances anti-inflammatory cytokines release associated with decrease in pro-inflammatory cytokines <sup>65</sup>, which is considered as beneficial for neuroprotection <sup>70</sup>. This also reduced iNOS, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and toll-like receptor 2 and 4 expression as well as increased IGF-1 and l'IL-10 <sup>67,68</sup>. Interestingly, ramified reactive microglia, localized within peri-ischemic area, positive to Iba-1 protein, do not express the

ED1 antigen (macrophagic marker overexpressed within the most affected areas by ischemia) as for resting microglia <sup>65</sup>. Interestingly, reactive microglia that do not express ED1 antigen could release neurotrophins <sup>71</sup>. However, high-intensity training in healthy rats (95-100 % of VO<sub>2max</sub>) could induce higher concentrations of BDNF and GDNF at cerebral level compared to MOD (80 % of VO<sub>2max</sub>) <sup>72</sup>. To support the assumption that HIT could enhance brain plasticity by acting on neurotrophins, we have quantified the level of p75<sup>NTR</sup>, which mediates the cellular functions of neurotrophins <sup>20</sup>. Our study is the first to measure the effectiveness of different training intensities on p75<sup>NTR</sup> expression within both hemispheres after severe cerebral ischemia and we found that HIT induced an increase of p75<sup>NTR</sup> at ipsilateral level. However, p75<sup>NTR</sup> expression could be associated with antagonist functions that complicates results interpretation <sup>73</sup>. It is difficult to establish whether the increase of p75<sup>NTR</sup> expression is associated with cellular death processes or with beneficial effects on neuroplasticity. Nevertheless, several results from literature allow us to suggest that this p75<sup>NTR</sup> expression might be beneficial. The p75<sup>NTR</sup> expression depends on the BDNF and/or other neurotrophin expression. Indeed, mature BDNF suppression, by injecting TrkB-FC, inhibited the increase of p75<sup>NTR</sup> expression after axotomia reducing the neuronal survival <sup>22,23</sup>. Following 8 weeks of endurance training at 13-17 m/min an training on aged rats, only one study found that the p75<sup>NTR</sup> level increase in parallel with an enhancement of BDNF expression <sup>21</sup>. Authors postulated that p75<sup>NTR</sup> increase could promote survival of damaged neurones, trigger apoptosis for cleaning debris and induce beneficial environment for axonal regrowth and inflammatory prevention <sup>20</sup>. Following cerebral ischemia, training stimulated endogenous expression of BDNF/TrkB within both hemispheres <sup>7,74-79</sup>. In addition, it was found that seven days of training are sufficient to enhance BDNF expression and improve motor recovery <sup>79-81</sup>. To reinforce our hypothesis on the potential role of p75<sup>NTR</sup>, it was demonstrated that aerobic training could facilitate the conversion of the proBDNF to the

mature BDNF (mBDNF) in diverse populations<sup>67,82,83</sup>. Infarction induced to the motor cortex by the photothrombotic stroke model, aerobic training up-regulates the expression of the mBDNF and down-regulate the proBDNF in the hippocampus and peri-ischemic regions that is associated with functional improvements<sup>7,84,85</sup>. In light of these findings, we suggested that the increase of p75<sup>NTR</sup> expression induced by HIT might reflect an increase of neurotrophin expression that might be beneficial for recovery.

The Cl<sup>-</sup> homeostasis was studied through the KCC2 and NKCC1 expression. Several studies found that BDNF could promote KCC2 expression after CNS trauma<sup>23,86,87</sup>. To the best of our knowledge, no study has determined the role of different aerobic trainings on the Cl<sup>-</sup> co-transporters following cerebral ischemia despite their crucial role in the CNS function<sup>24</sup>. It was postulated in our study that HIT could influence the Cl<sup>-</sup> homeostasis by changing the KCC2 and NKCC1 expression that might modulate the equilibrium between excitation and inhibition in brain.

Finally, no infarct volume difference appeared between HIT and MOD programs while both grip force and aerobic fitness recoveries were improved in agreement with a previous study<sup>37</sup>. Indeed, it has been observed that the lesion size could not completely explain the observed functional deficits. Interestingly, HIT did not increase the infarct volume revealing that high training intensities may not be deleterious.

## **Conclusion**

This study provides new insights into the effectiveness of HIT on the physiological determinants of aerobic capacities, grip strength improvement and cerebral plasticity compared to MOD program, despite lower exercise duration. The present study also gives new information on physiological performance determinants in the acute phase from changes of the S<sub>LT</sub> and S<sub>max</sub> parameters. According to previous human studies and the results of the

present investigation, it seems that the effectiveness of HIT should be assessed with the associated physiological adaptations in individuals with moderate stroke, that might offers some promising perspectives.

## **Acknowledgments**

We are grateful to Alain DONNEAUD for technical support.

## **Sources of Funding**

None

## **Disclosures**

None

## **References**

1. Ivey FM, Macko RF, Ryan AS, Hafer-Macko CE. Cardiovascular health and fitness after stroke. *Top. Stroke Rehabil.* 2005;12:1–16.
2. Marsden DL, Dunn A, Callister R, Levi CR, Spratt NJ. Characteristics of exercise training interventions to improve cardiorespiratory fitness after stroke: a systematic review with meta-analysis. *Neurorehabil. Neural Repair.* 2013;27:775–788.
3. Pang MYC, Charlesworth SA, Lau RWK, Chung RCK. Using aerobic exercise to improve health outcomes and quality of life in stroke: evidence-based exercise prescription recommendations. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 2013;35:7–22.
4. Schmidt A, Wellmann J, Schilling M, Strecker J-K, Sommer C, Schabitz W-R, et al. Meta-analysis of the Efficacy of Different Training Strategies in Animal Models of Ischemic Stroke. *Stroke.* 2014;45:239–247.
5. Macko RF, Ivey FM, Forrester LW, Hanley D, Sorkin JD, Katzel LI, et al. Treadmill Exercise Rehabilitation Improves Ambulatory Function and Cardiovascular Fitness in Patients With Chronic Stroke: A Randomized, Controlled Trial. *Stroke.* 2005;36:2206–2211.
6. Billinger SA, Arena R, Bernhardt J, Eng JJ, Franklin BA, Johnson CM, et al. Physical Activity and Exercise Recommendations for Stroke Survivors: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2014;45:2532–2553.
7. Ke Z, Yip SP, Li L, Zheng X-X, Tong K-Y. The Effects of Voluntary, Involuntary, and Forced Exercises on Brain-Derived Neurotrophic Factor and Motor Function Recovery: A Rat Brain Ischemia Model. *PLoS ONE.* 2011;6:e16643.

8. Bosch PR, Holzapfel S, Traustadottir T. Feasibility of Measuring Ventilatory Threshold in Adults With Stroke-Induced Hemiparesis: Implications for Exercise Prescription. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 2015;96:1779–1784.
9. Ivey FM, Hafer-Macko CE, Macko RF. Exercise rehabilitation after stroke. *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 2006;3:439–450.
10. Monga TN, Deforge DA, Williams J, Wolfe LA. Cardiovascular responses to acute exercise in patients with cerebrovascular accidents. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 1988;69:937–940.
11. Tomczak CR, Jelani A, Haennel RG, Haykowsky MJ, Welsh R, Manns PJ. Cardiac reserve and pulmonary gas exchange kinetics in patients with stroke. *Stroke J. Cereb. Circ.* 2008;39:3102–3106.
12. Zhang P, Zhang Y, Zhang J, Wu Y, Jia J, Wu J, et al. Early Exercise Protects against Cerebral Ischemic Injury through Inhibiting Neuron Apoptosis in Cortex in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:6074–6089.
13. Zhang Y, Zhang P, Shen X, Tian S, Wu Y, Zhu Y, et al. Early Exercise Protects the Blood-Brain Barrier from Ischemic Brain Injury via the Regulation of MMP-9 and Occludin in Rats. *Int. J. Mol. Sci.* 2013;14:11096–11112.
14. Matsuda F, Sakakima H, Yoshida Y. The effects of early exercise on brain damage and recovery after focal cerebral infarction in rats. *Acta Physiol. Oxf. Engl.* 2011;201:275–287.
15. Mizutani K, Sonoda S, Hayashi N, Takasaki A, Beppu H, Saitoh E, et al. Analysis of protein expression profile in the cerebellum of cerebral infarction rats after treadmill training. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* 2010;89:107–114.
16. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J. Neuroimmunol.* 2007;184:53–68.
17. McAlees JW, Smith LT, Erbe RS, Jarjoura D, Ponzio NM, Sanders VM. Epigenetic regulation of beta2-adrenergic receptor expression in TH1 and TH2 cells. *Brain. Behav. Immun.* 2011;25:408–415.
18. Trang T, Beggs S, Salter MW. ATP receptors gate microglia signaling in neuropathic pain. *Exp. Neurol.* 2012;234:354–361.
19. Zhao G, Zhou S, Davie A, Su Q. Effects of moderate and high intensity exercise on T1/T2 balance. *Exerc. Immunol. Rev.* 2012;18:98–114.
20. Meeker R, Williams K. The p75 neurotrophin receptor: at the crossroad of neural repair and death. *Neural Regen. Res.* 2015;10:721.
21. Vilela TC, Muller AP, Damiani AP, Macan TP, da Silva S, Canteiro PB, et al. Strength and Aerobic Exercises Improve Spatial Memory in Aging Rats Through Stimulating Distinct Neuroplasticity Mechanisms. *Mol. Neurobiol.* 2016;
22. Shulga A, Magalhaes AC, Autio H, Plantman S, di Lieto A, Nykjaer A, et al. The Loop Diuretic Bumetanide Blocks Posttraumatic p75NTR Upregulation and Rescues Injured Neurons. *J. Neurosci.* 2012;32:1757–1770.
23. Shulga A, Thomas-Crusells J, Sigl T, Blaesse A, Mestres P, Meyer M, et al. Posttraumatic GABA(A)-mediated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase is essential for the induction of brain-derived neurotrophic factor-dependent survival of mature central neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2008;28:6996–7005.
24. Ben-Ari Y. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002;3:728–739.
25. Kaila K, Price TJ, Payne JA, Puskarjov M, Voipio J. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2014;15:637–654.



26. Côté M-P, Gandhi S, Zambrotta M, Houlié JD. Exercise modulates chloride homeostasis after spinal cord injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 2014;34:8976–8987.
27. Tang A, Sibley KM, Thomas SG, McIlroy WE, Brooks D. Maximal exercise test results in subacute stroke. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 2006;87:1100–1105.
28. Globas C, Becker C, Cerny J, Lam JM, Lindemann U, Forrester LW, et al. Chronic Stroke Survivors Benefit From High-Intensity Aerobic Treadmill Exercise: A Randomized Control Trial. *Neurorehabil. Neural Repair.* 2012;26:85–95.
29. Ivey FM, Stookey AD, Hafer-Macko CE, Ryan AS, Macko RF. Higher Treadmill Training Intensity to Address Functional Aerobic Impairment after Stroke. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* 2015;24:2539–2546.
30. Boyne P, Dunning K, Carl D, Gerson M, Khoury J, Rockwell B, et al. High-Intensity Interval Training and Moderate-Intensity Continuous Training in Ambulatory Chronic Stroke: Feasibility Study. *Phys. Ther.* 2016;96:1533–1544.
31. Gjellesvik TI, Brurok B, Hoff J, Tørhaug T, Helgerud J. Effect of high aerobic intensity interval treadmill walking in people with chronic stroke: a pilot study with one year follow-up. *Top. Stroke Rehabil.* 2012;19:353–360.
32. Gibala MJ. High-intensity interval training: a time-efficient strategy for health promotion? *Curr. Sports Med. Rep.* 2007;6:211–213.
33. Askim T, Dahl AE, Aamot IL, Hokstad A, Helbostad J, Indredavik B. High-intensity aerobic interval training for patients 3-9 months after stroke: a feasibility study. *Physiother. Res. Int. J. Res. Clin. Phys. Ther.* 2014;19:129–139.
34. Nokia MS, Lensu S, Ahtiainen JP, Johansson PP, Koch LG, Britton SL, et al. Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained: Aerobic exercise promotes adult neurogenesis. *J. Physiol.* 2016;594:1855–1873.
35. Gibala MJ, Little JP, MacDonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease: Adaptations to low-volume, high-intensity interval training. *J. Physiol.* 2012;590:1077–1084.
36. Zhang Q-W, Deng X-X, Sun X, Xu J-X, Sun F-Y. Exercise Promotes Axon Regeneration of Newborn Striatonigral and Corticonigral Projection Neurons in Rats after Ischemic Stroke. *PLoS ONE.* 2013;8:e80139.
37. Risedal A, Zeng J, Johansson BB. Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 1999;19:997–1003.
38. Choe M-A, An GJ, Lee Y-K, Im JH, Choi-Kwon S, Heitkemper M. Effect of Early Low-Intensity Exercise on Rat Hind-Limb Muscles Following Acute Ischemic Stroke. *Biol. Res. Nurs.* 2006;7:163–174.
39. Faude O, Kindermann W, Meyer T. Lactate threshold concepts: how valid are they? *Sports Med. Auckl. NZ.* 2009;39:469–490.
40. Marzolini S, Oh P, McIlroy W, Brooks D. The effects of an aerobic and resistance exercise training program on cognition following stroke. *Neurorehabil. Neural Repair.* 2013;27:392–402.
41. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* 2007;14:753–760.
42. Pin-Barre C, Laurin J, Felix M-S, Pertici V, Kober F, Marqueste T, et al. Acute Neuromuscular Adaptation at the Spinal Level Following Middle Cerebral Artery Occlusion-Reperfusion in the Rat. *PLoS ONE.* 2014;9:e89953.

43. Billat VL. Inter- and intrastain variation in mouse critical running speed. *J. Appl. Physiol.* 2005;98:1258–1263.
44. Carvalho JF, Masuda MO, Pompeu FAMS. Method for diagnosis and control of aerobic training in rats based on lactate threshold. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2005;140:409–413.
45. Jafari A, Faizi MAH, Askarian F, Pourrazi H. Effect of regular aerobic exercise with ozone exposure on peripheral leukocyte populations in Wistar male rats. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* 2009;14:277–283.
46. Bentley DJ, Newell J, Bishop D. Incremental exercise test design and analysis: implications for performance diagnostics in endurance athletes. *Sports Med. Auckl. NZ.* 2007;37:575–586.
47. Brito Vieira WH, Halsberghe MJE, Schwantes MLB, Perez SEA, Baldissera V, Prestes J, et al. Increased lactate threshold after five weeks of treadmill aerobic training in rats. *Braz. J. Biol. Rev. Brasleira Biol.* 2014;74:444–449.
48. Pederson BA, Cope CR, Schroeder JM, Smith MW, Irimia JM, Thurberg BL, et al. Exercise Capacity of Mice Genetically Lacking Muscle Glycogen Synthase: IN MICE, MUSCLE GLYCOGEN IS NOT ESSENTIAL FOR EXERCISE. *J. Biol. Chem.* 2005;280:17260–17265.
49. Rognmo Ø, Hetland E, Helgerud J, Hoff J, Slørdahl SA. High intensity aerobic interval exercise is superior to moderate intensity exercise for increasing aerobic capacity in patients with coronary artery disease. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil. Off. J. Eur. Soc. Cardiol. Work. Groups Epidemiol. Prev. Card. Rehabil. Exerc. Physiol.* 2004;11:216–222.
50. Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognmo Ø, Haram PM, et al. Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation.* 2007;115:3086–3094.
51. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates [Internet]. Amsterdam; Boston; Oxford: Academic; 2006 [cited 2016 Dec 2]. Available from: <http://site.ebrary.com/id/10378802>
52. Ludwig A, Li H, Saarma M, Kaila K, Rivera C. Developmental up-regulation of KCC2 in the absence of GABAergic and glutamatergic transmission. *Eur. J. Neurosci.* 2003;18:3199–3206.
53. Luo CX, Jiang J, Zhou QG, Zhu XJ, Wang W, Zhang ZJ, et al. Voluntary exercise-induced neurogenesis in the posts ischemic dentate gyrus is associated with spatial memory recovery from stroke. *J. Neurosci. Res.* 2007;85:1637–1646.
54. Ploughman M, Granter-Button S, Chernenko G, Tucker BA, Mearow KM, Corbett D. Endurance exercise regimens induce differential effects on brain-derived neurotrophic factor, synapsin-I and insulin-like growth factor I after focal ischemia. *Neuroscience.* 2005;136:991–1001.
55. Griesbach G., Hovda D., Molteni R, Wu A, Gomez-Pinilla F. Voluntary exercise following traumatic brain injury: brain-derived neurotrophic factor upregulation and recovery of function. *Neuroscience.* 2004;125:129–139.
56. Stoller O, de Bruin ED, Knols RH, Hunt KJ. Effects of cardiovascular exercise early after stroke: systematic review and meta-analysis. *BMC Neurol.* [Internet]. 2012 [cited 2016 Nov 14];12. Available from: <http://bmneurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2377-12-45>
57. Gibala MJ, McGee SL. Metabolic adaptations to short-term high-intensity interval training: a little pain for a lot of gain? *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2008;36:58–63.
58. Takahashi H, Himi N, Kuniyasu K, Koga T. Changes in the lactate threshold during treadmill exercise after microsphere-induced infarction in rats. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis. Off. J. Natl. Stroke Assoc.* 2012;21:647–651.

59. Tang A, Sibley KM, Thomas SG, Bayley MT, Richardson D, McIlroy WE, et al. Effects of an Aerobic Exercise Program on Aerobic Capacity, Spatiotemporal Gait Parameters, and Functional Capacity in Subacute Stroke. *Neurorehabil. Neural Repair*. 2008;23:398–406.
60. Laursen PB, Jenkins DG. The scientific basis for high-intensity interval training: optimising training programmes and maximising performance in highly trained endurance athletes. *Sports Med. Auckl. NZ*. 2002;32:53–73.
61. Holloway TM, Bloemberg D, da Silva ML, Simpson JA, Quadrilatero J, Spriet LL. High intensity interval and endurance training have opposing effects on markers of heart failure and cardiac remodeling in hypertensive rats. *PLoS One*. 2015;10:e0121138.
62. Jo S, Jeong T, Lee JB, Jin YH, Yoon J, Jun YK, et al. Initial hyperlactatemia in the ED is associated with poor outcome in patients with ischemic stroke. *Am. J. Emerg. Med*. 2012;30:449–455.
63. Thomas C, Bishop D, Moore-Morris T, Mercier J. Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2007;293:E916–922.
64. Balaban B, Tok F, Yavuz F, Yaşar E, Alaca R. Early rehabilitation outcome in patients with middle cerebral artery stroke. *Neurosci. Lett*. 2011;498:204–207.
65. Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y. Enhanced Expression of Iba1, Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule 1, After Transient Focal Cerebral Ischemia In Rat Brain. *Stroke*. 2001;32:1208–1215.
66. Cherry JD, Olschowka JA, O'Banion M. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation*. 2014;11:98.
67. Jensen SK, Yong VW. Microglial modulation as a mechanism behind the promotion of central nervous system well-being by physical exercise. *Clin. Exp. Neuroimmunol*. 2014;5:188–201.
68. Svensson M, Lexell J, Deierborg T. Effects of Physical Exercise on Neuroinflammation, Neuroplasticity, Neurodegeneration, and Behavior: What We Can Learn From Animal Models in Clinical Settings. *Neurorehabil. Neural Repair*. 2015;29:577–589.
69. Wang J, Song H, Tang X, Yang Y, Vieira VJ, Niu Y, et al. Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scand. J. Med. Sci. Sports*. 2012;22:643–652.
70. Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C, Doerr H, Sommer C, Rivest S, et al. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat. Med*. 2009;15:192–199.
71. Ito T, Couceiro JN, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol*. 1998;72:7367–7373.
72. Afzalpour ME, Chadorneshin HT, Foadoddini M, Eivari HA. Comparing interval and continuous exercise training regimens on neurotrophic factors in rat brain. *Physiol. Behav*. 2015;147:78–83.
73. Lu B, Pang PT, Woo NH. The yin and yang of neurotrophin action. *Nat. Rev. Neurosci*. 2005;6:603–614.
74. Kawamata T, Alexis NE, Dietrich WD, Finklestein SP. Intracisternal basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances behavioral recovery following focal cerebral infarction in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab*. 1996;16:542–547.
75. Schäbitz WR, Schwab S, Spranger M, Hacke W. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab*. 1997;17:500–506.

76. Schäbitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke J. Cereb. Circ.* 2000;31:2212–2217.
77. Kiprianova I, Sandkühler J, Schwab S, Hoyer S, Spranger M. Brain-derived neurotrophic factor improves long-term potentiation and cognitive functions after transient forebrain ischemia in the rat. *Exp. Neurol.* 1999;159:511–519.
78. Cupini LM, Diomedi M, Placidi F, Silvestrini M, Giacomini P. Cerebrovascular Reactivity and Subcortical Infarctions. *Arch. Neurol.* [Internet]. 2001 [cited 2016 Nov 19];58. Available from: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneur.58.4.577>
79. Kim M-W, Bang M-S, Han T-R, Ko Y-J, Yoon B-W, Kim J-H, et al. Exercise increased BDNF and trkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain. *Brain Res.* 2005;1052:16–21.
80. Kokaia Z, Zhao Q, Kokaia M, Elmér E, Metsis M, Smith ML, et al. Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp. Neurol.* 1995;136:73–88.
81. Zhao LR, Mattsson B, Johansson BB. Environmental influence on brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression after middle cerebral artery occlusion in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience.* 2000;97:177–184.
82. Ding G, Jiang Q, Li L, Zhang L, Wang Y, Zhang ZG, et al. Cerebral tissue repair and atrophy after embolic stroke in rat: A magnetic resonance imaging study of erythropoietin therapy. *J. Neurosci. Res.* 2010;88:3206–3214.
83. Sartori CR, Vieira AS, Ferrari EM, Langone F, Tongiorgi E, Parada CA. The antidepressive effect of the physical exercise correlates with increased levels of mature BDNF, and proBDNF proteolytic cleavage-related genes, p11 and tPA. *Neuroscience.* 2011;180:9–18.
84. Kim H-J, Cho M-H, Shim WH, Kim JK, Jeon E-Y, Kim D-H, et al. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Mol. Psychiatry* [Internet]. 2016 [cited 2016 Nov 14]; Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/mp.2016.103>
85. Quirié A, Hervieu M, Garnier P, Demougeot C, Mossiat C, Bertrand N, et al. Comparative Effect of Treadmill Exercise on Mature BDNF Production in Control versus Stroke Rats. *PLoS ONE.* 2012;7:e44218.
86. Boulenguez P, Liabeuf S, Bos R, Bras H, Jean-Xavier C, Brocard C, et al. Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat. Med.* 2010;16:302–307.
87. Eftekhari S, Mehrabi S, Karimzadeh F, Joghataei M, Khaksarian M, Hadjighassem M, et al. Brain Derived Neurotrophic Factor Modification of Epileptiform Burst Discharges in a Temporal Lobe Epilepsy Model. *Basic Clin. Neurosci. J.* [Internet]. 2016 [cited 2016 Dec 30];7. Available from: [http://bcn.iums.ac.ir/browse.php?a\\_id=529&sid=1&slc\\_lang=en](http://bcn.iums.ac.ir/browse.php?a_id=529&sid=1&slc_lang=en)

## Figure Legends

### Figure 1.

**Forelimb grip force. A)** on the left forepaw, **B)** L/R ratio.

\*significant decrease from D1 to D14 in injured-groups compared to PRE (except for HIT at D7 and D14). #significant increase from D7 to D14 for HIT group compared to PRE. +L/R or left forepaw grip force for injured-groups is lower than non-injured groups from D1 to D14 (except for HIT at D7 and D14). §L/R or left forepaw grip force is higher for HIT group compared to MOD and MCAO groups at D7 and D14.

**C) The elevated body swing test.**

\*left swings/total swing increase at D1, D7 and D14 compared to PRE for injured-groups. +higher left swings/total swing for MCAO, HIT and MOD groups compared to Control and SHAM groups from D1 to D14 ( $p < 0.001$ ).

**D) Successful score (% of PRE).**

\*significant decrease at D1, D7 and D14 compared to PRE for injured-groups. The successful score increased from D1 to D14 for MCAO (#), HIT (§) and MOD ( $\varphi$ ).

+lower successful score for injured-groups compared to Control and SHAM groups.

### Figure 2.

**A) Resting blood lactate at D15.**

\*resting lactatemia (mmol/L) increase between D1 and D14 for MCAO group only ( $p < 0.001$ ).

+higher resting lactatemia for MCAO group compared to Control, SHAM, HIT and MOD groups at D14 ( $p < 0.001$ ).

**B)  $S_{LT}$  (m/min) and  $S_{max}$  (m/min) at D1 after cerebral ischemia.**

+lower  $S_{LT}$  and  $S_{max}$  for MCAO, HIT and MOD groups compared to Control and SHAM ( $p < 0.001$ ).

**C)  $S_{LT}$  (m/min) and  $S_{max}$  (m/min) after training.**

\* $S_{LT}$  and  $S_{max}$  increase between D1 and D14 for HIT and MOD groups ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$  respectively). <sup>†</sup>higher  $S_{LT}$  and  $S_{max}$  at D14 in HIT, Control and SHAM groups compared to MCAO and MOD groups ( $p < 0.001$  for  $S_{LT}$ ;  $p < 0.05$  for  $S_{max}$  compared to MOD group). <sup>‡</sup>higher  $S_{LT}$  and  $S_{max}$  at D14 in MOD group compared to MCAO group ( $p < 0.05$  for  $S_{LT}$  and  $p < 0.05$  for  $S_{max}$ ).

**D) Example of lactatemia kinetic (raw data) obtained during the incremental test of the same animal performed before (n) and after (€) 2 weeks of HIT program.**

The running speed of HIT training was based on the observed  $S_{LT}$  at D1. In this example, we can see that  $S_{LT}$  was moved forward higher speed from D1 (24 m/min) to D14 (36 m/min) after HIT training suggesting an enhancement of aerobic fitness. The arrows indicate the lactate threshold.

**Figure 3.**

***The impact of exercise training on microglial cells morphology on rat with cerebral ischemia.***

Quantification of microglia morphology changes at peri-ichemic level in **A)** ipsilateral and **C)** in contralateral hemisphere. In both hemispheres, the % of amoeboid Iba-1+ cells is significantly lower in HIT group than in *MCAO* ( $+p < 0.001$  and  $p < 0.01$ ) and MOD (\* ;  $p < 0.01$  and  $p < 0.01$ ) groups. Example of immunofluorescent staining with Iba-1 protein on *MCAO*, MOD and HIT groups in **B)** ipsilateral and **D)** contralateral hemispheres. Green arrows indicate ramified reactive microglial cells whereas red arrows indicate amoeboid microglial cells. IP : ipsilateral ; CT : contralateral.

#### **Figure 4.**

##### **The impact of exercise training on p75<sup>NTR</sup> expression on rat with cerebral ischemia.**

Expression of p75<sup>NTR</sup> normalized to SHAM condition. **A)** # indicates a significant increase of p75<sup>NTR</sup> expression in HIT (p<0.001) and MOD (p<0.01) groups compared to SHAM group at the ipsilateral hemisphere level. **B)** No difference was observed in the contralateral hemisphere. **C)** Illustration of p75<sup>NTR</sup> immunostaining in the ipsilateral hemisphere within SHAM, MCAO, MOD and HIT groups

#### **Figure 5.**

##### **The impact of exercise training on NKCC1/KCC2 ratio on rat with cerebral ischemia.**

The NKCC1/KCC2 ratio is significantly lower in HIT groups than the one of MOD (\*) and MCAO (+) groups.

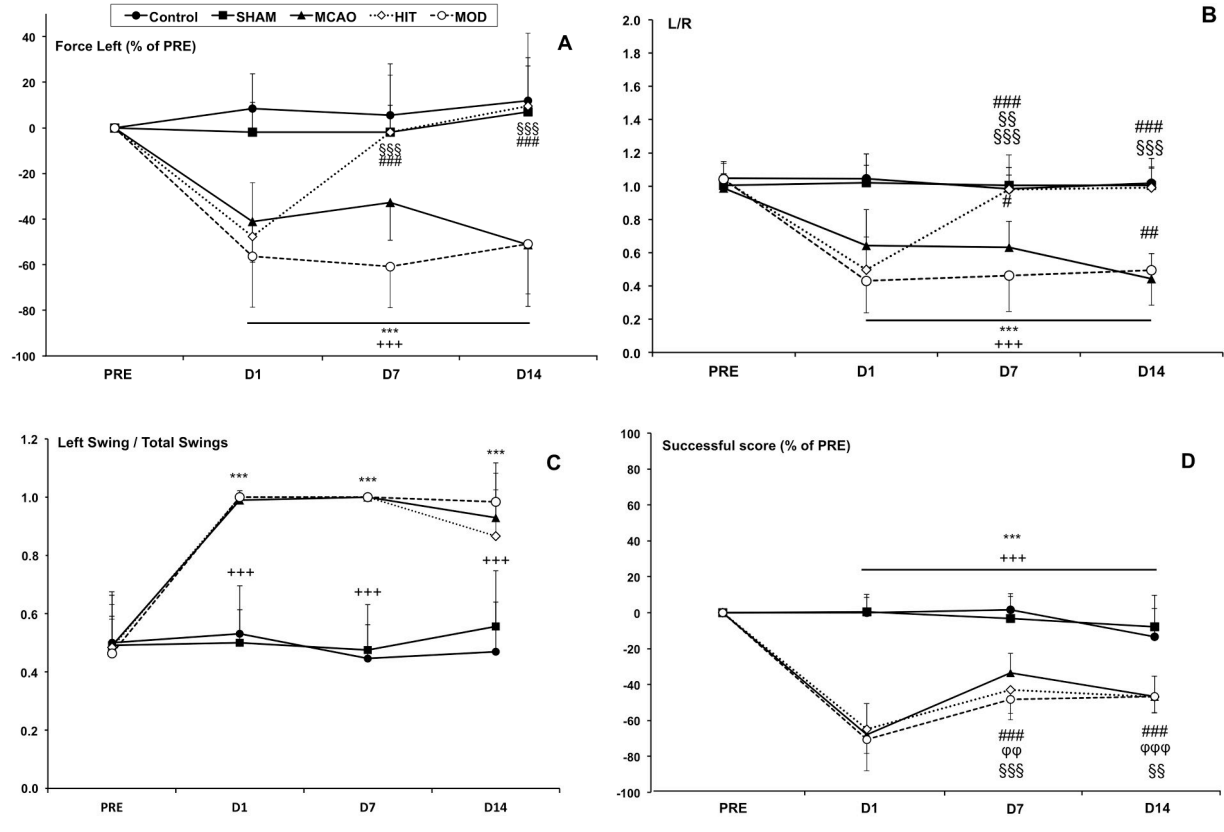
**Table 1**

	HIT		MOD	
	Week-1	Week-2	Week-1	Week-2
Work speed (m/min)	24.5±2.6	25.4±2.7	17.5±2.6	17.5±2.6
Recovery speed (m/min)	20.2±2.4	20.2±2.4	None	None
Session duration (min)	28	28	41.8±9.5	44.8±12.3
Total Workload (joules)	1458±210	1654±342	1458±210	1654±342

**Table 1:** *HIT and MOD features in terms of exercise intensity, duration and energy expenditure.* Given that MOD training is characterized by continuous exercise at moderate intensity without rest intervals, “None” indicated that these animals did not perform periods of recovery speed during exercise sessions. We can observe that the total workload was the same between groups because the energy expenditure needs to be equivalent between exercise types in order to only compare the influence of intensity on the measured parameters.



**Figure 1**



**Figure 2**

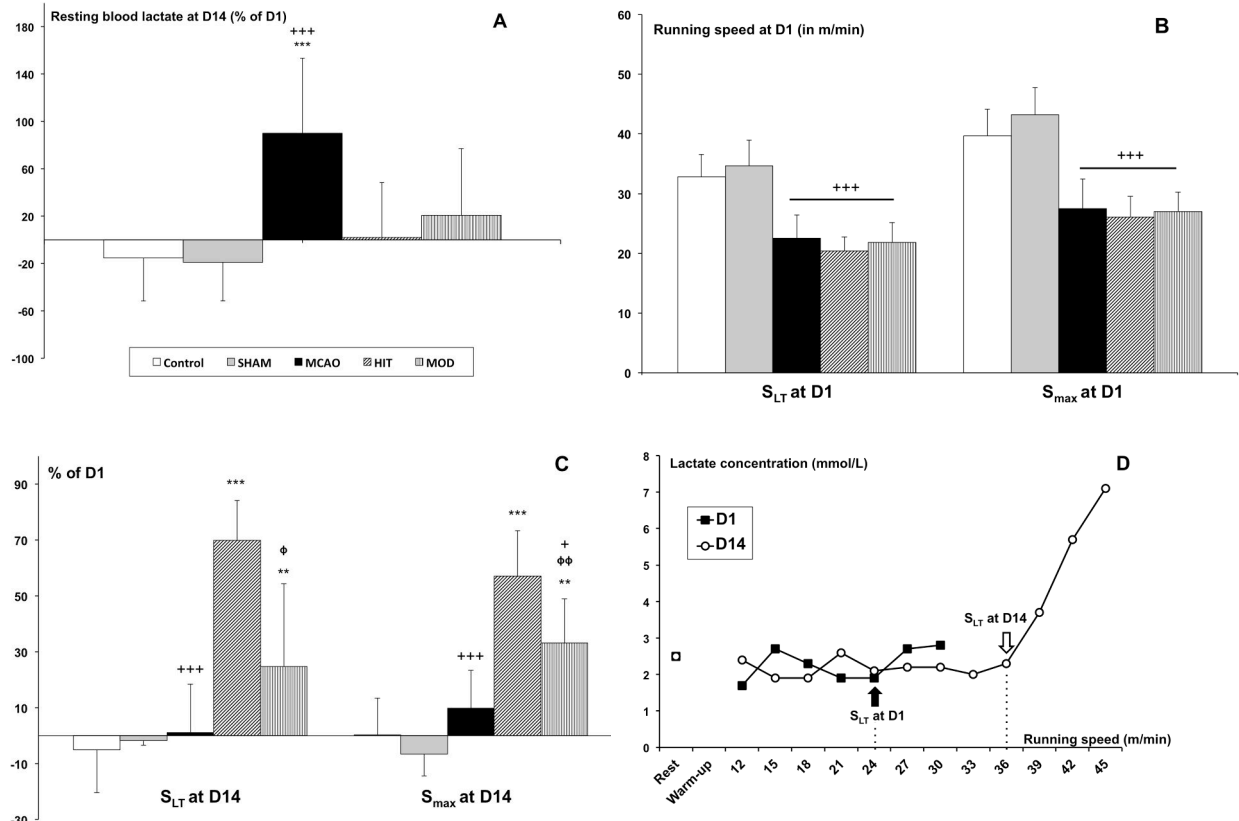
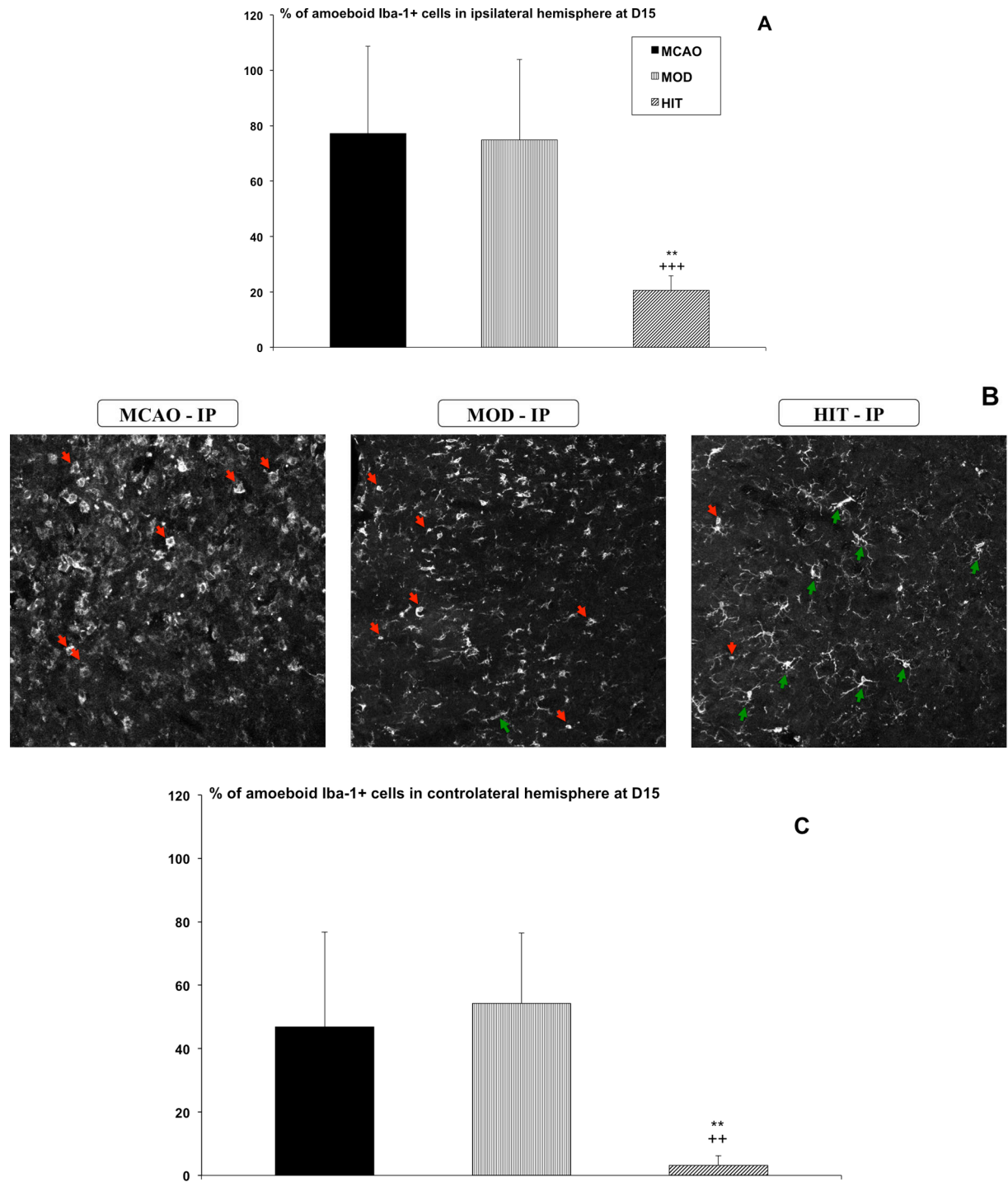


Figure 3



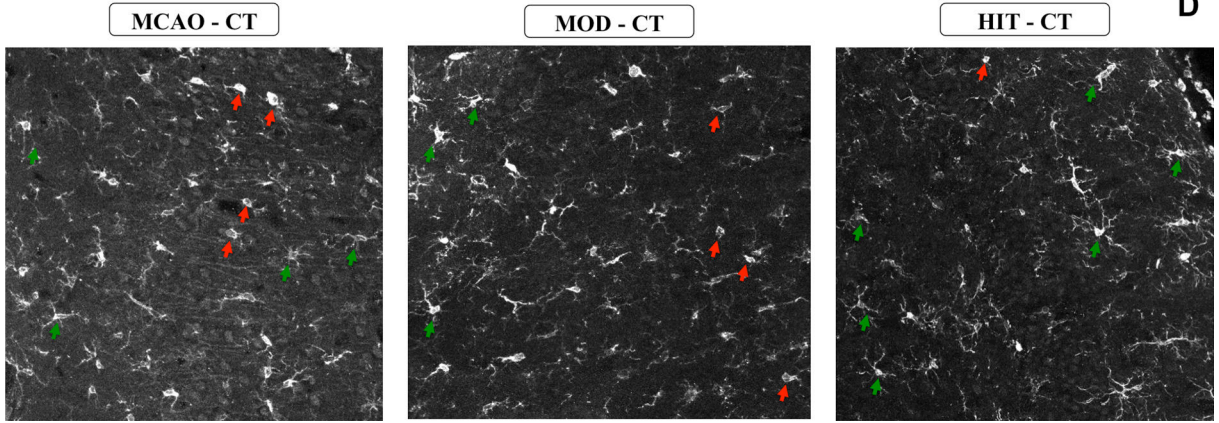
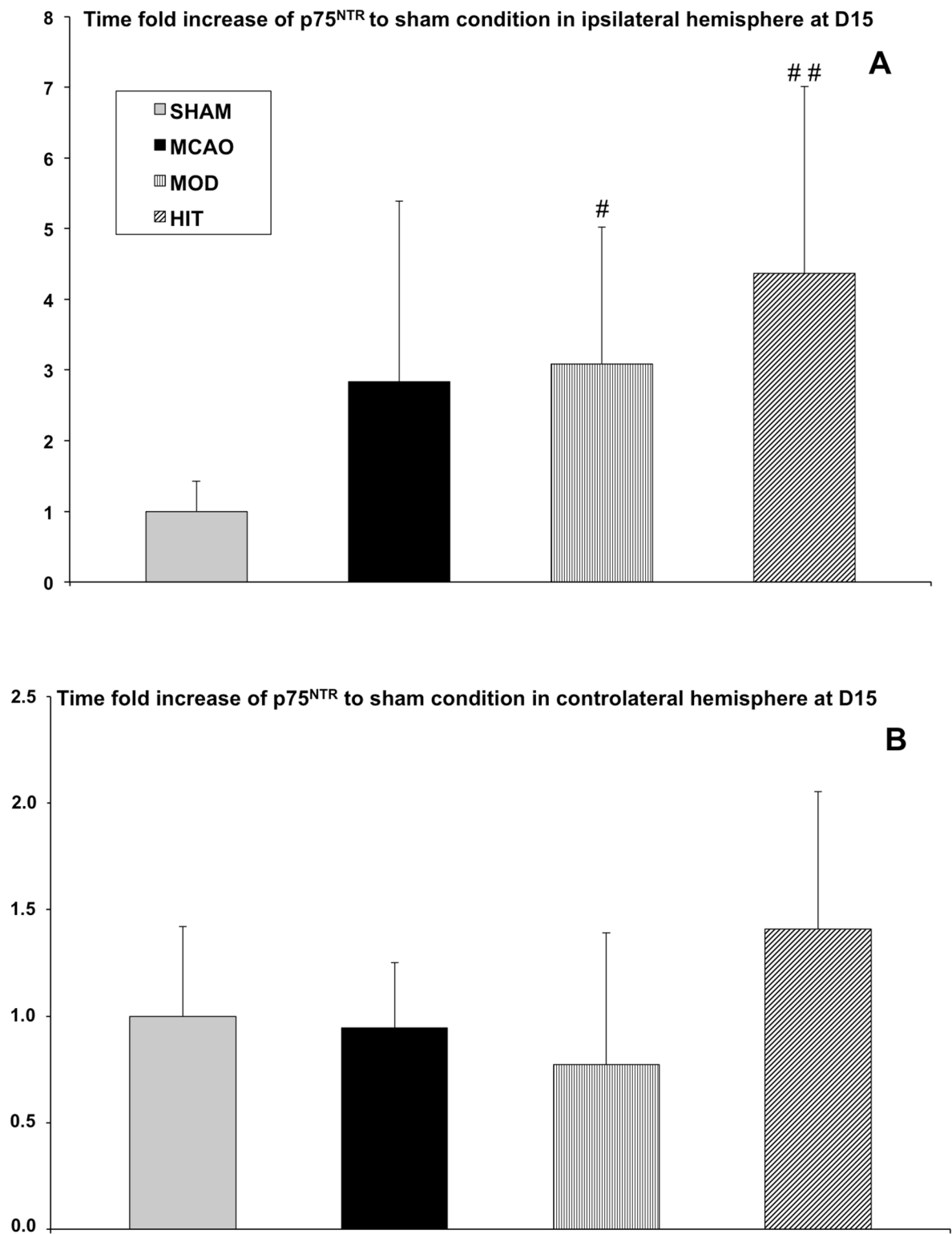


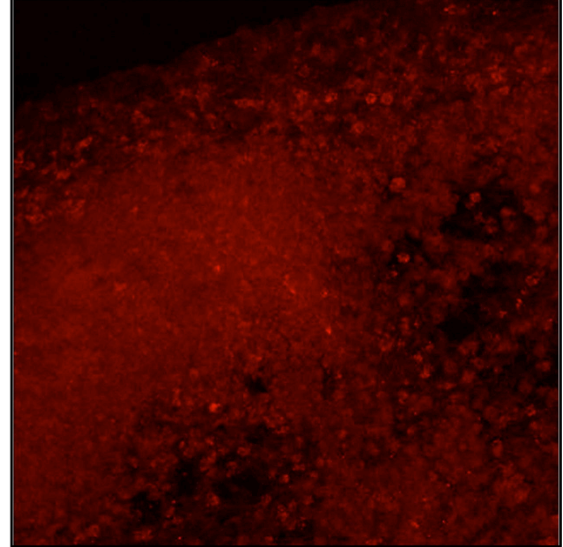
Figure 4



SHAM - IP



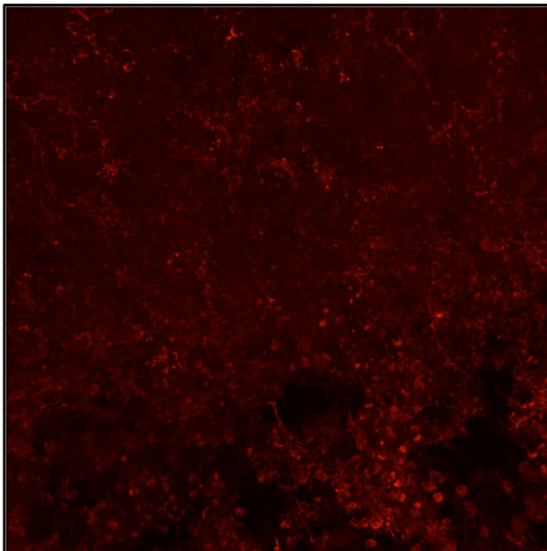
MCAO - IP



C

p75<sup>NTR</sup>

MOD - IP



HIT - IP

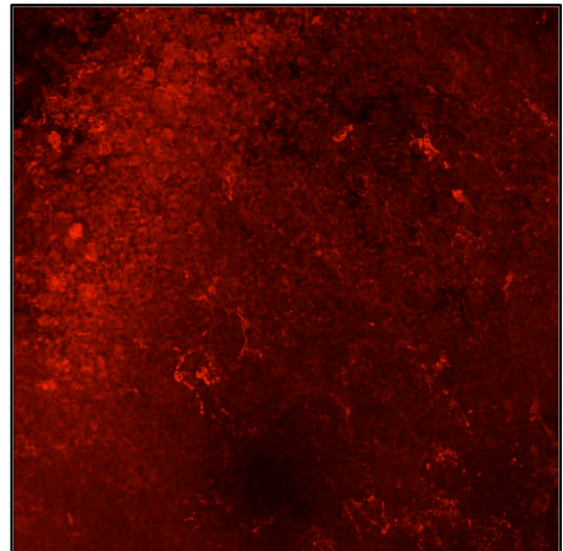
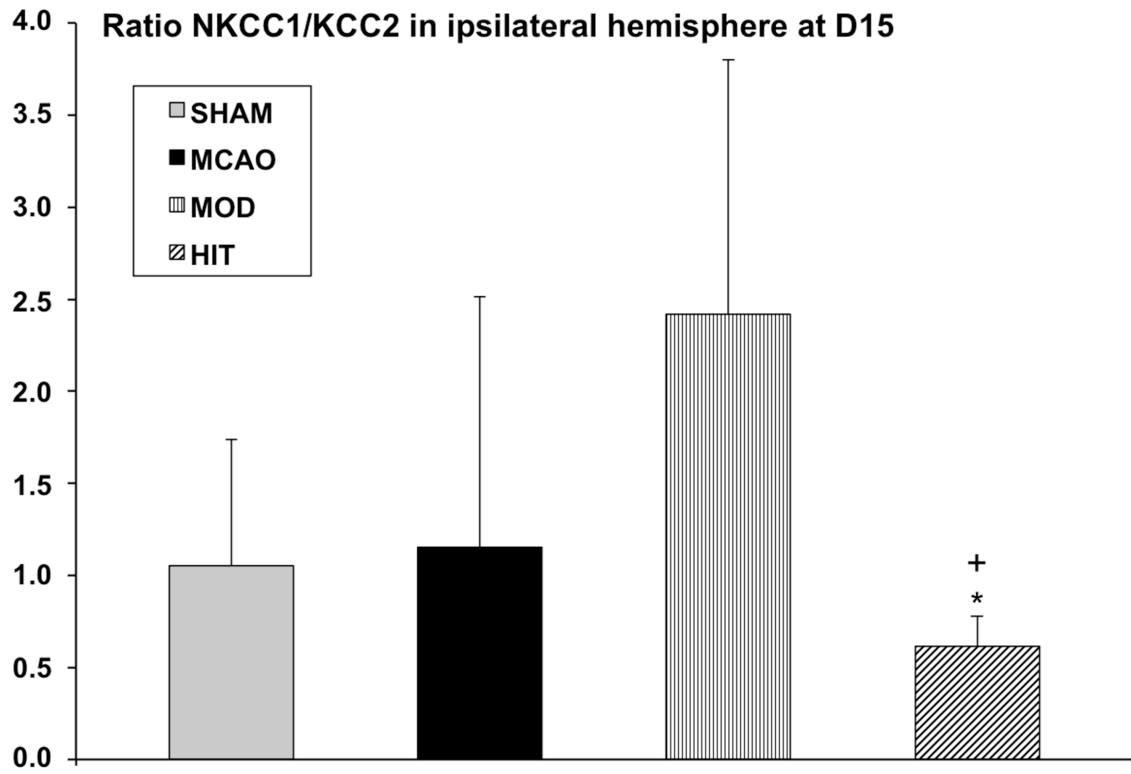


Figure 5



# Résumé

L'accident vasculaire cérébral (AVC) est un problème majeur de santé publique car les troubles fonctionnels associés ont des répercussions délétères sur la qualité de vie et l'indépendance des patients mais aussi au niveau économique. Ce travail de thèse est centré autour de 2 axes de recherche portant sur l'ischémie cérébrale chez le rat. Pour le premier axe, il s'agira d'étudier la plasticité au niveau spinal en analysant les modifications de la régulation des réflexes somatiques qui peuvent contribuer à expliquer en partie les déficits fonctionnels. Nos résultats montrent d'une part une fatigue précoce au cours d'un exercice isométrique du triceps brachial et une perturbation de l'inhibition du réflexe-H post-exercice. Nous avons précisé que la perturbation de l'activité des voies réflexes est associée à une modification de l'action inhibitrice des afférences musculaires des groupes III et IV pouvant expliquer la fatigue précoce et les déficits fonctionnels observés. Le deuxième axe concerne l'entraînement en endurance qui est une stratégie prometteuse pour traiter les déficits mais qui reste à optimiser. L'objectif est ici de déterminer quelle est la stratégie d'endurance la plus appropriée en nous focalisant sur l'intensité de l'exercice. Pour cela, les effets des exercices d'intensités modérées (classiquement recommandés) ont été confrontés avec ceux des exercices de hautes intensités (HIT, *High-Intensity Interval training*) en analysant la récupération fonctionnelle et la neuroplasticité cérébrale. Nos résultats montrent que l'intensité de travail, déterminée à partir du seuil lactique, est un paramètre crucial car les HIT se révèlent être plus efficaces en termes de récupération de la force de préhension, d'aptitude aérobie et de neuroplasticité. Ces travaux ouvrent de nombreuses perspectives où ces 2 axes pourraient se rejoindre en approfondissant les effets des HIT au niveau cérébral et spinal.

---

## Mots clés

Ischémie cérébrale, réflexes somatiques spinaux, plasticité spinale, exercice d'endurance, intensité d'exercice, neuroplasticité, récupération fonctionnelle, AVC.

## Abstract

Stroke is a major public health issue because associated functional disorders have detrimental impacts on life quality and independence of patients as well as on economic state. This thesis work is focused on 2-research axis concerning cerebral ischemia in rat. The aim of the first axis is to study plasticity at spinal level by investigating the alteration of somatic reflex regulation that could contribute to partially explain functional deficits. Our results show early fatigue of *triceps brachii* during an isometric contraction and H-reflex inhibition perturbation post-exercise. We also observed that the disturbance of reflex pathway activity is associated with a decrease of the inhibitory effect induced by muscular metabosensitive afferents that might explain early fatigue and observed functional deficits. The second axis treats about endurance training that is a promising strategy to reduce stroke-induced disorders but remains to improve. In that way, the purpose is to determine which endurance strategy is the most suitable by focusing on exercise intensity. In order to ensure this, the effects of moderate intensity exercise (classically recommended) have been compared to high intensity interval training (HIT) by analysing the functional recovery and cerebral neuroplasticity. Our data show that work intensity, based on lactic threshold, is a critical parameter. Indeed, HIT is more effective for increasing grip strength recovery, aerobic capacity as well as promoting neuroplasticity. The results of these 2 lines of research could be now associated by deepening the HIT effects at cerebral and spinal level that lead to numerous perspectives.

---

## Keywords

Cerebral ischemia, spinal somatic reflexes, spinal plasticity, endurance training, exercise intensity, neuroplasticity, functional recovery, stroke.